

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik München IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Rolle des Interferon-regulatorischen Faktors 4 in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marc Johannes Weidenbusch
aus München
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Robert Besch

Priv.-Doz. Dr. Antje Habicht

Prof. Dr. Ralph Mocikat

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2015

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2010 bis Februar 2011 in der Abteilung für klinische Biochemie in der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

(Direktor: Herr Prof. Dr. med. Martin Reincke)

Förderung:

Die vorliegende Arbeit wurde durch das DFG-Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres gefördert. M.J.W. erhielt zusätzlich eine ideelle Förderung von der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Aus der Promotion ging folgende Originalarbeit als Veröffentlichung hervor:

Lech M*, **Weidenbusch M***, Kulkarni OP, Ryu M, Darisipudi MN, Susanti HE, Mittruecker HW, Mak TW, Anders HJ. IRF4 deficiency abrogates lupus nephritis despite enhancing systemic cytokine production. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Aug;22(8):1443-52.

*geteilte Erstautorenschaft.

meinen lieben Eltern
Elisabeth und Joseph Weidenbusch
voll Dankbarkeit und Bewunderung

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Der systemische Lupus erythematoses	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Klinisches Bild des systemischen Lupus erythematoses.....	2
1.1.3 Therapie	4
1.1.4 Tiermodelle des systemischen Lupus erythematoses	5
1.2 Das Immunsystem	8
1.2.1 Innate (= angeborene) Immunität	9
1.2.2 Adaptive (=erworbene) Immunität.....	11
1.3 Autoimmunität und SLE.....	14
1.3.1 Genetisch bedingter Toleranzverlust und Umweltfaktoren.....	14
1.3.2 Mechanismen der Immunisierung gegen nukleäre Antigene	16
1.3.3 Die Familie der Interferon-regulatorischen Faktoren	20
1.4 Die Funktionen von IRF4 im Immunsystem.....	22
1.5 Forschungshypothese und Zielsetzung	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Tierversuche.....	25
2.1.2 Blut- und Urinuntersuchungen	26
2.1.3 Histologie	26
2.1.4 Durchflusszytometrie.....	27
2.1.5 Zellkulturversuche.....	28
2.1.6 ELISA-Materialien.....	29
2.1.7 Reverse Transkriptase-quantitative Polymerasenkettenreaktion	29
2.1.8 Basischemikalien	30
2.1.9 Primersequenzen	30
2.1.10 Geräte.....	32
2.2 Methoden	34

2.2.1	Tierversuche	34
2.2.2	Zellkultur	37
2.2.3	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	39
2.2.4	Durchflusszytometrie	43
2.2.5	Histologische Untersuchungen	45
2.2.6	mRNA-Expressionsanalysen	46
2.2.7	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	IRF4 reguliert die Entzündungsaktivität in B6 ^{lpr} Mäusen	50
3.2	IRF4 hat unterschiedliche Wirkungen in TLR-Signalwegen	52
3.3	IRF4 reguliert Ausreifung und Aktivierung von Milz-APCs	55
3.4	IRF4-Defizienz verhindert im B6 ^{lpr} Tiermodell Endorganschaden	58
3.4.1	B6 ^{lpr/lrf4-/-} Mäuse entwickeln keine Lupusnephritis	58
3.4.2	B6 ^{lpr/lrf4-/-} Mäuse sind vor autoimmunem Lungenschaden geschützt	64
3.5	IRF4 und die Antikörperproduktion	65
3.5.1	IRF4-Defizienz schützt vor dem Auftreten von Autoantikörpern	65
3.5.2	IRF4 reguliert die Serumantikörperkonzentration im B6 ^{lpr} Modell	66
3.6	IRF4 vermittelt Plasmazelldifferenzierung im B6 ^{lpr} Tiermodell	67
3.7	IRF4 reguliert T-Helferzell-Differenzierung im B6 ^{lpr} Tiermodell	70
4	Diskussion	72
4.1	Systemische Entzündung in B6 ^{lpr/lrf4-/-} Mäusen	73
4.2	Schutz vor Endorganschaden bei B6 ^{lpr/lrf4-/-} Mäusen	76
4.3	Limitationen der Studie und Ausblick	80
5	Zusammenfassung	82
6	Abkürzungsverzeichnis	83
7	Literaturverzeichnis	87
8	Danksagung	98
9	Lebenslauf	99

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 ACR-Kriterien des SLE und klinische Häufigkeit	3
Abbildung 1-2 Schema wichtiger Komponenten des Immunsystems.....	7
Tabelle 1-3 Die wichtigsten Bestandteile des Immunsystems	9
Abbildung 1-4 B- und T-Zellreifung.....	13
Tabelle 1-5 Lupus-Suszeptibilitätsgene	14
Tabelle 1-6 Verschiedene Familien und wichtige Vertreter der PRRs.....	17
Abbildung 1-7 Signalwege der Mustererkennungsrezeptoren	19
Tabelle 2-1 Details verwendeter ELISA-Verfahren	42
Abbildung 2-2 Durchflusszytometrie	44
Abbildung 3-1 Systemische Entzündung in B6 ^{Ipr/Irf4-/-} Mäusen	51
Abbildung 3-2 Splenozyten-Stimulationsexperimente.....	53
Abbildung 3-3 BMDC-Stimulationsexperimente	53
Abbildung 3-4 PBMC-Stimulationsexperimente.....	54
Abbildung 3-5 Durchflusszytometrische Analyse splenischer APC-Populationen	56
Abbildung 3-6 Expression M1- vs. M2-assozierter mRNA Marker in der Milz	56
Abbildung 3-7 mRNA Expression in CD11c+ Splenozyten	57
Abbildung 3-8 Renale Funktionsparameter.....	58
Abbildung 3-9 Lupusnephritis Aktivität- und Chronizitätscores.....	59
Abbildung 3-10 Nierenhistologie	60
Abbildung 3-11 intrarenale mRNA-Expression verschiedener Mφ-Polarisationsmarker	61
Abbildung 3-12 intrarenale Zytokine, TLR- und Chemokinrezeptor mRNA-Expression.....	62
Abbildung 3-13 mRNA-Analyse der IRF4 und IRF5-Expression renaler Zellpopulationen	63
Abbildung 3-14 Peribronchiale Entzündung mit Leukozyteninfiltraten.....	64
Abbildung 3-15 ANA-Screening mit Hep-2 Zellen.....	65
Abbildung 3-16 Serumkonzentrationen von Gesamtantikörpern und Autoantikörpern	66
Abbildung 3-17 Unabhängig vom Irf4-Genotyp erhaltene Follikel-Architektur der Milz.....	67
Abbildung 3-18 B-Zell-Subpopulationen in der Milz und in Peritoneum	68
Abbildung 3-19 mRNA-Expression in CD19+ Splenozyten.....	69
Abbildung 3-20 mRNA-Expression in splenischen T-Zellen	70
Abbildung 3-21 T-Zell-Subpopulationen in der Milz.....	71

1 Einleitung

1.1 Der systemische Lupus erythematoses

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) handelt es sich um eine schwere Autoimmunerkrankung, bei der es durch eine unkontrollierte Aktivierung des Immunsystems zu einer Autoimmunpathologie und Gewebsschädigung kommt, die jedes Organ im Körper betreffen kann (Liu and Davidson, 2012). Charakteristisch ist das Auftreten von Antikörpern gegen Zellkernbestandteile (antinukleäre Antikörper, ANA), die je nach molekularer Zielstruktur weiter differenziert werden können (Rahman and Isenberg, 2008). Die große Heterogenität der klinischen Präsentationen des SLE und die relative Seltenheit der Erkrankung führen oft zu Schwierigkeiten, die Krankheit korrekt zu diagnostizieren. So wird die Prävalenz des SLE weltweit auf 20 bis 150 Fällen pro 100.000 (Pons-Estel et al., 2010) geschätzt, wobei aktuell jährlich in Nordamerika, Asien und Europa 1 bis 25 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern diagnostiziert werden (Danchenko et al., 2006) und Frauen ca. 10x häufiger betroffen sind als Männer. Dabei verursacht der SLE ökonomisch gesehen durch notwendige Behandlungen und Arbeitsausfälle in den USA im Moment Kosten von umgerechnet mehr als 10 Mrd. Euro pro Jahr (Turchetti et al., 2012). Da nach wie vor keine kausale Therapie zur Verfügung steht, die Prognose durch symptomatische Behandlungen in den letzten Jahrzehnten aber deutlich gebessert werden konnte, wird davon ausgegangen, dass diese Kosten kontinuierlich steigen werden. Trotz einem aktuellen 5-Jahres-Überleben von über 90 Prozent und einem 15-Jahres-Überleben von ca. 85%, ist, da die überwältigende Mehrheit der Patienten Frauen im gebärfähigen Alter sind, hier anzumerken, dass eine von sechs Patientinnen, die im Alter von 20 Jahren am SLE erkrankt, vor dem Erreichen des 35. Lebensjahres verstirbt (Tsokos, 2011). Der SLE ist damit nach wie vor eine tödliche Krankheit, wobei in den ersten 10 Jahren die terminale Niereninsuffizienz bei zunehmender Zerstörung durch das Immunsystem, Infektionen u.a. aufgrund der therapeutischen Immunsuppression sowie eine beim SLE beschleunigt verlaufende Atherosklerose mit ihren Sequelae Myokardinfarkt und Apoplexie (Bernatsky et al., 2012) als Todesursachen von Bedeutung sind.

1.1.2 Klinisches Bild des systemischen Lupus erythematoses

Die Diagnose wird anhand der 11 Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) gesichert (siehe Tabelle 1-1), von denen für eine formale Klassifikation 4 vorhanden sein müssen. Die ACR-Kriterien machen deutlich, dass der SLE, der klinisch dem Formenkreis der Kollagenosen („Bindegewebserkrankungen“) zugeordnet wird, prinzipiell jedes Organ befallen kann, wobei Tabelle 1-1 auch die relative Häufigkeit der einzelnen Manifestationen ausweist. Neben diesen Kriterien berichten die Patienten sehr häufig von Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust. Ebenfalls möglich sind als okuläre Manifestation eine Keratoconjunctivitis sicca, eine Episkleritis, eine Uveitis sowie ein Zentralarterien- oder -venenverschluss (Peponis et al., 2006) und gastrointestinale Symptome wie Appetitlosigkeit, Übelkeit/Erbrechen, Durchfall sowie abdominelle Schmerzen (Kiriakidou et al., 2013). Treten diese konstitutionellen Symptome zusammen mit Gelenkbeschwerden auf, sollte nicht nur nach einem SLE-typischen Ausschlag gesucht werden, sondern auch anamnestisch eine erhöhte Photosensitivität abgeklärt werden. Während in der kauasischen Bevölkerung die Konstellation mit B-Symptomen, Arthritis und Hautausschlag als Initialpräsentation häufig ist (bis zu 70 %), finden sich insbesondere bei lateinamerikanischen Patienten bereits bei Erstdiagnose Proteinurie, hämatologische Abnormalitäten oder Hämoptysen (Chang and Werth, 2011). Oft findet sich klinisch bei SLE-Patienten auch ein sog. Overlap-Syndrom, also das gleichzeitige Auftreten von SLE und einer anderen Erkrankung aus dem rheumatologischen Formenkreis, z.B. Sklerodermie (Iaccarino et al., 2013). Daher ist es oft klinisch sinnvoll, auch bei diagnostiziertem SLE eine neue Organbeteiligung bioptisch zu sichern, bevor eine Therapieentscheidung getroffen wird. So findet sich bei diagnostizierten SLE-Patienten mit neuem Kreatinin-Anstieg in bis zu 30% der Fälle eine nicht-SLE-Nierenpathologie. Die klinische Differentialdiagnose bei SLE beinhaltet u.a. auch andere Kleingefäßvaskulitiden, z.B. die ANCA-assoziierten Entitäten Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und mikroskopische Polyangiitis (MPA). Hier sind laborchemisch der Nachweis von ANAs sowie anti-dsDNA- oder Anti-Smith-Antikörper oft hilfreich. Die beiden letztgenannten Antikörper sind auch bei bereits etablierter SLE-Diagnose hilfreich, da sie gut mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Rahman and Isenberg, 2008). Oft mit Anti-Histon-Antikörpern verbunden ist der Medikamenten-induzierte SLE. Als Auslöser bekannt sind u.a. Procainamid, Minocyclin, Hydralazin, Isoniazid, TNF α -Inhibitoren sowie verschiedenen ACE-Inhibitoren und IFN- α -Präparate (Patel and Richardson, 2012).

Tabelle 1-1 ACR-Kriterien des SLE und klinische Häufigkeit

ACR-Kriterien	Häufigkeit als Erstmanifestation	Kumulative Häufigkeit
Schmetterlingserythem	24%	61%
Diskoide Hautläsion	5%	12%
Photosensibilität	25%	56%
Orale Ulzera	11%	42%
Arthritis	67%	93%
Serositis	4%	12% (Pleuritis) 17% (Perikarditis)
Nierenerkrankung	5%	46%
ZNS-Erkrankung	4%	8% (Krampfleiden) 4% (Psychose)
Hämatologische Störung	2% (Anämie) 5% (Thrombozytopenie)	12% (Anämie) 42% (Leukopenie) 19% (Thrombozytopenie)
Immunologische Störung	nicht angegeben	71% (Anti-dsDNA) 48% (Anti-Sm)
Antinukleäre Antikörper	nicht angegeben	98%

dsDNA = doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure, Sm = Smith-Antigen

[nach (Hochberg, 1997; Pons-Estel et al., 2004)]

Diese SLE-Form verläuft insgesamt aber eher milde und ist nach Absetzen des auslösenden Medikaments meist reversibel.

Beim SLE treten auch Autoantikörper auf, die Strukturen außerhalb des Zellkerns binden. Direkt antikörpervermittelte SLE-Komplikationen sind die Autoimmunhämolyse und – thrombozytopenie, durch Anti-Phospholipid-Antikörper hervorgerufene arterielle Thrombosen (Antiphospholipidsyndrom), sowie manche Formen der SLE-Cerebritis. Hier führen Antikörper gegen neuronale Kalziumkanäle vom N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Typ zu hippocampaler Schädigung und subsequenten Gedächtnisstörungen. In der Schwangerschaft kann es zum Auftreten von Antikörpern gegen fetale Kardiomyozytenantigene kommen, die bei der Mutter keinen myokardialen Schaden setzen, aber aufgrund ihrer Plazentagängigkeit beim Feten durch Zerstörung des Reizleitungssystems einen kongenitalen AV-Block III° verursachen (Buyon and Clancy, 2003).

1.1.3 Therapie

Neben der Eliminierung von Triggern (i.e. Rauchstopp und konsequenter UV-Schutz) kommt für die sehr häufigen Hautmanifestationen der Einsatz steroidhaltiger Crèmes oder, bei isoliert kutanem Lupus, topischer Calcineurininhibitoren (z.B. Tacrolimus) infrage, für die ebenfalls häufigen, nicht-erosiven Arthritiden nicht-steroidale Antirheumatika (NSARs). Für die Behandlung des allgemeinen Krankheitsgefühls, Fiebers und adjunktiv auch für Haut- und Gelenkmanifestationen ist das Antimalariamittel Hydroxychloroquin zugelassen. Bei milden bis moderaten Schüben können, zeitlich begrenzt, auch orale Steroide eingesetzt werden. Die Lupusnephritis (LN) als eine der schweren und lebensbedrohlichen Komplikationen muss, nach Diagnosesicherung und Klassifizierung durch Nierenbiopsie deutlich aggressiver behandelt werden, da z.B. die Klasse IV LN (diffus-proliferativer Typ) unbehandelt praktisch immer zum Dialyse-pflichtigen Nierenversagen führt. Insbesondere die Nierenbeteiligung hat beim SLE auch großen Einfluss auf die Prognose *quoad vitam*: Während die durchschnittliche Lebenserwartung des SLE-Patienten im Vergleich zur Gesamtbevölkerung um 12 Jahre verringert ist, sind es beim Nierenbefall 15 Jahre und beim signifikanten Nierenschaden 24 Jahre (Mok et al., 2013). Für die Behandlung der Lupusnephritis kommen neben systemischen Steroiden klassische Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclophosphamid oder Mykophenolat zur Anwendung (Houssiau, 2012). Wie eingangs angesprochen, ist keine dieser Therapien als kausal zu betrachten und häufig kommt es auch unter Therapie zu weiteren Schüben. Zusätzlich wird die Therapie durch signifikante Nebenwirkungen kompliziert: Erhöhte gastrointestinale Komplikationen bzw. erhöhtes Myokardinfarkt-Risiko unter NSARs bzw. COX2-Hemmern, Hautatrophien unter topischen und Cushing-Syndrom unten systemischen Steroiden, Sehstörungen unter Hydroxychloroquin sowie eine ausgeprägte Infektanfälligkeit sowie erhöhte Hautkrebs-Inzidenz bei generalisierter Immunsuppression. Mit Einführung der sogenannten „Biologika“, also insbesondere Antikörper, die gezielt in immunologische Signalwege eingreifen, wurden und werden auch beim SLE viele Studien durchgeführt (Clark et al., 2013; Furtado and Isenberg, 2013; Merrill et al., 2010a; Merrill et al., 2010b). Während viele dieser Studien ihre klinischen Endpunkte verfehlten (Merrill et al., 2010a; Merrill et al., 2010b; Rovin et al., 2012), kam es dadurch zur ersten Neuzulassung eines Medikamentes für den SLE seit 56 Jahren: 2011 wurde Belimumab, ein komplett humanisierter BLyS-Antikörper, zur Behandlung von Patienten, die trotz Standardtherapie eine hohe SLE-Aktivität aufweisen,

zugelassen (La Cava, 2013). Dennoch ist das medikamentöse Armamentarium in vielen Fällen unbefriedigend, sodass es weiterhin hohen Bedarf für klinische Studien gibt und experimentell weiterhin sehr aggressive Therapieversuche wie z.B. Stammzelltransplantationen unternommen werden (Collins and Gilkeson, 2013). Um neue Therapien für den SLE zu entwickeln besteht weiterhin die Notwendigkeit zur Grundlagenforschung, da nur ein tiefer gehendes Verständnis der Pathogenese eine gezielte, effektive und nebenwirkungsarme Therapie ermöglicht.

1.1.4 Tiermodelle des systemischen Lupus erythematoses

Studien am Menschen sind mit vielen ethischen Problemen verbunden. In der Pathogenese- und Therapieforschung kommen daher oft Modellsysteme zur Anwendung. Menschliche Zellkultursysteme sind kaum mit ethischen Problemen verbunden, haben aber den Nachteil einer starken Reduzierung der *in vivo* vorhandenen Interaktionen. Tiermodelle bilden diese Komplexität besser ab. Verfügbare Modelle reichen mit steigender ethischer Problematik von der Verwendung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* über den Zebrafisch *Danio rerio* bis zu Untersuchungen an Mäusen, Schweinen, Hunden und Affen. Großer Stellenwert kommt aktuell dem Mausmodell bei, da Mäuse als Säugetiere bzgl. vieler Fragestellungen hinreichend genau die humane Biologie wiederspiegeln, die Haltung vergleichsweise einfach ist und es weit entwickelte Methoden der genetischen Veränderung der Tiere gibt. Neben der Haltung in Form von genetisch homogenen Inzuchtstämmen ist insbesondere die sogenannte *Knock-out*-Technologie (Robertson et al., 1986) wichtig. Diese ermöglicht es, einzelne Gene im Erbgut der Maus gezielt zu deaktivieren. Anhand des Phänotyps der so generierten *Knock-out*(KO-)Maus und den Unterschieden zu Wildtyp(WT-)Mäusen kann *in vivo* die Funktion des ausgeschalteten Gens untersucht werden.

Der SLE ist nicht auf die Spezies Mensch beschränkt, sondern kommt z.B. auch bei Hunden, Katzen, Pferden und Affen vor (Geor et al., 1990; Halliwell, 1982; Lewis et al., 1965; Malinow et al., 1982). Dabei sind die Manifestationen des SLE in keiner Spezies gleich der anderen, dem humanen sehr ähnlich ist der SLE des Hundes (Lewis et al., 1965). Neben den weitestgehend gleichen Organmanifestationen ist das Tiermodell des caninen SLE vor allem interessant, da es eines der wenigen Modelle ist, in denen der SLE, so wie auch beim Menschen, in einem Wechsel von Exazerbationen und Remissionen verläuft (Fournel et al.,

1992). Für die Forschung am wichtigsten sind trotz vieler Limitationen die diversen Mausmodelle des SLE (Perry et al., 2011): Das älteste und klassische Mausmodell des SLE ist die Kreuzung von schwarzen und weißen Neuseeland-Mäusen (*New Zealand [Bielschowsky] Black / White*). Die Filialgeneration (NZB/NZW-F1) entwickelt eine hämolytische Anämie mit LE-Zellen im peripheren Blut, eine Typ V Lupusnephritis mit tubulointerstitiellen Infiltraten, eine lupoide Hepatitis sowie eine Milzfibrose (Dubois et al., 1966). Die Krankheitsaktivität ist in weiblichen Tieren deutlich stärker ausgeprägt, sodass weibliche NZB/NZW-F1-Tiere eine durchschnittliche Überlebensdauer von 9 Monaten vs. 14 Monaten bei männlichen Tieren haben. Todesursache ist meist die Lupusnephritis. Im Gegensatz zum humanen SLE kommt es in diesem Mausmodell nicht zum Auftreten von Antikörpern gegen RNA-Protein-Partikel (*small nuclear ribonucleoproteins*, snRNPs, u.a. Smith-Antigen) und auch nicht zu klinisch relevanten Hautveränderungen. Ein weiteres, weit verbreitetes Mausmodell des SLE sind *Murphy Roths Large* (MRL) Mäuse (Andrews et al., 1978). In MRL-Mäusen kommt es sowohl bei männlichen wie weiblichen Tieren gleichermaßen unter anderem zum Auftreten einer Lupusnephritis und Autoantikörperbildung gegen DNA- und RNA-haltige Strukturen. Die Krankheit beginnt allerdings spät und die Tiere erreichen ein Alter von bis zu 24 Monaten. Durch das Auftreten einer weiteren Mutation im MRL-Mausstamm kommt es zu einer massiven Verschlimmerung des Phänotyps mit sehr hohen Antikörper-Titern, den typischen SLE-Hautveränderungen, einer Lupusnephritis, einer Polyarthritiden, vaskulitischen Myokardinfarkten sowie zusätzlich einer generalisierten Lymphoproliferation. Diese Mäuse sterben geschlechtsunabhängig im Alter von 6-8 Monaten. Die zusätzliche Mutation, *lpr* (*lymphoproliferation*) verändert die Expression des Apoptose-induzierenden Fas-Rezeptors (Reap et al., 1995). Die Apoptoseinduktion in Lymphozyten ist folglich defekt und durch die großen Mengen sekundär nekrotischer Lymphozyten entsteht ein großes Angebot nukleärer Antigene, das im SLE-suszeptiblen MRL-Hintergrund den schweren Krankheitsverlauf bedingt. Ein Problem des MRL^{lpr}- und des NZB/NZW-F1 Modells ist der genetische Hintergrund der Tiere. Da die meisten KO-Mäuse nicht in diesen beiden Inzuchtstämmen generiert werden, ist zur Verwendung der KO-Tiere im SLE-Modell oftmals eine langwierige Rückkreuzung der Tiere erforderlich, um schließlich den gewünschten Gen-Defekt im vollständigen genetischen Hintergrund des SLE-Modell-Inzuchtstammes untersuchen zu können und Veränderungen so eindeutig dem ausgeschalteten Gen und nicht der bloßen Vermischung zweier Inzuchtstämme zuordnen zu können. Eine Alternative dazu ist die Verwendung induzierbarer SLE-Modelle, in der Maus steht hierzu die intraperitoneale

Injektion der Mäuse mit dem Terpentinoidalkan Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) zu Verfügung, die unter anderem in den sehr weit verbreiteten Inzuchtstämmen C57/Bl6 und BALB/c zur SLE-Entstehung führt und die direkte Verwendung von KO-Mäusen dieses genetischen Hintergrundes erlaubt (Satoh et al., 1995). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die oben angesprochene *lpr*-Mutation des Fas-Rezeptors auf C57/Bl6-Tiere zu übertragen. Obwohl C57/Bl6 Mäuse auch im Alter keinerlei Zeichen einer Autoimmunkrankheit zeigen, entwickeln C57/Bl6^{*lpr*}-Mäuse, ganz ähnlich den MRL^{*lpr*}-Tieren SLE-Manifestationen wie Autoantikörperproduktion gegen Doppelstrang-DNA sowie snRNPs und eine Lupusnephritis, auch wenn die Krankheitsaktivität generell geringer ist. Da die Fas^{*lpr*} Mutation im C57/Bl6-Inzuchtstamm ausreichend ist, eine SLE-ähnliche Erkrankung zu erzeugen, können diese Tiere direkt mit KO-Mäusen aus einem C57/Bl6-Hintergrund verpaart werden, ohne die Syngenetität des Inzuchtstammes zu zerstören.

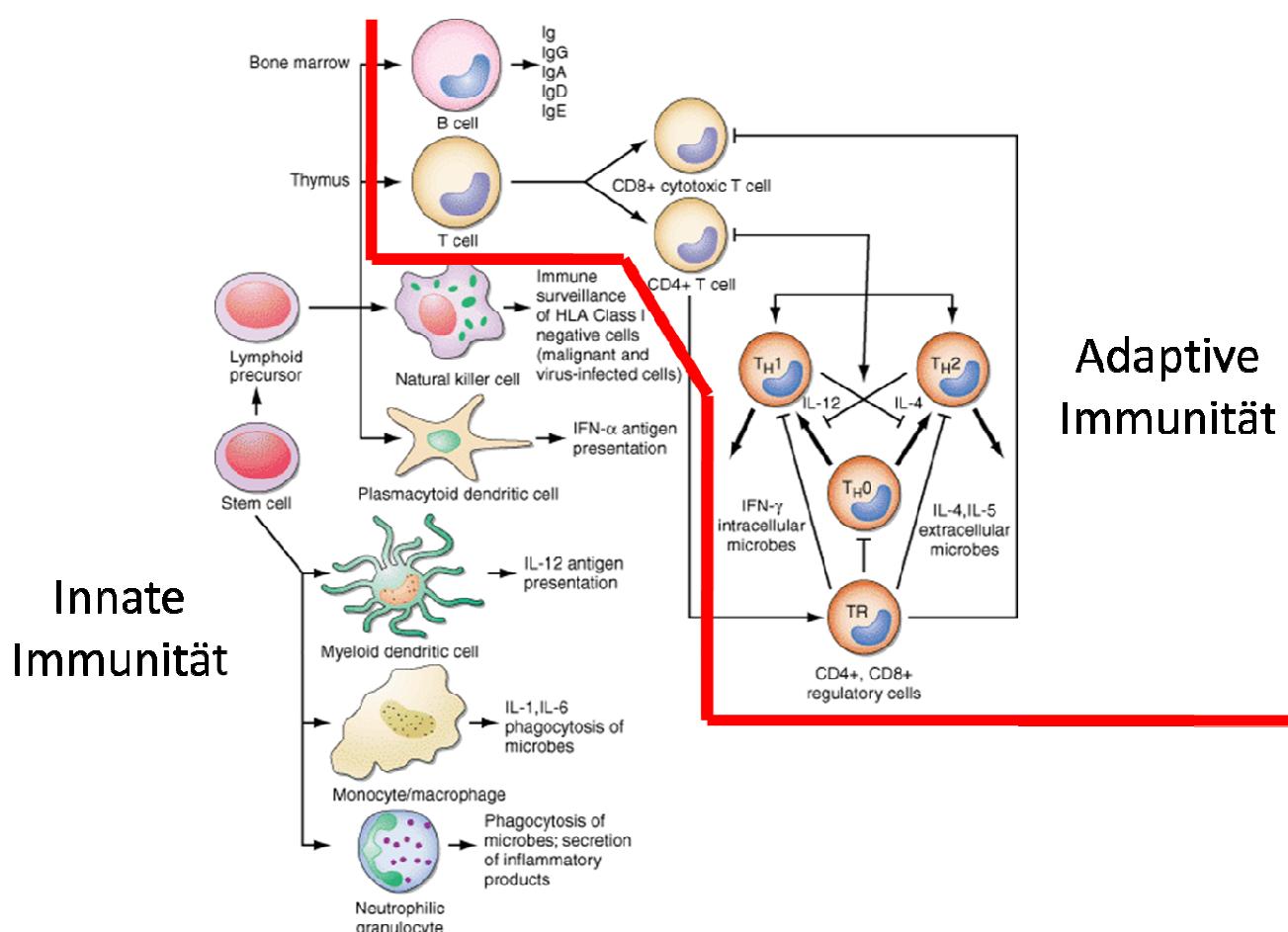


Abbildung 1-2 Schema wichtiger Komponenten des Immunsystems [mod. nach (Fauci, 2008)]

CD=cluster of differentiation; HLA=humane Leukozytenantigen; Ig=Immunglobulin; IFN=Interferon; IL=Interleukin; Th1/2=T-Helferzelle Typ 1/2; TR=regulatorische T-Zelle

1.2 Das Immunsystem

Die Zellzahl des menschlichen Körpers wird in der Größenordnung von 10^{14} geschätzt, wobei nur 10% dieser Zellen eukaryotisch sind (Savage, 1977). Die überwältigende Mehrheit der Zellen in unserem Körper sind Darmbakterien, die nicht unser Genom teilen (Gill et al., 2006) und daher im eigentlichen Sinne als „fremd“ anzusehen sind. Keine der mehreren hundert bakteriellen Spezies, die als Kommensalen ständig die Darmmukosa besiedeln (Eckburg et al., 2005), wird jedoch angegriffen, während Pathogene wie Meningokokken oder Pseudomonaden im Regelfall wirkungsvoll eradiziert werden (Consortium, 2012). Dies ist Ausdruck der hoch differenzierten Aktivität unseres Immunsystems. Seine Aufgaben sind:

1. effektive Bekämpfung von Pathogenen aus dem breiten Spektrum von Bakterien über Pilze und Protozoen bis hin zu Viren,
2. Kontrolle und Akzeptanz der Gesamtheit der symbiotischen Kommensalen (wenngleich „Fremd“),
3. Eliminierung neoplastischer, ursprünglich körpereigener Zellen („immunological surveillance“) und, wie bereits Paul Ehrlich treffend erkannte, am wichtigsten,
4. Toleranz von körpereigenen Strukturen („Selbst“).

Abbildung 1-2 zeigt die einzelnen Komponenten sowie die gebräuchliche Unterteilung des Immunsystems in innaten und adaptiven Schenkel. Das innate Immunsystem ist evolutisch älter und in Teilen bereits in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) vorhanden (Gilmore and Wolenski, 2012). Ihm obliegt die einerseits schnelle, andererseits immer gleich ablaufende Antwort auf Pathogene. Unter dem Begriff „Innate Immunität“ werden gewöhnlich als humorale Komponenten v.a. das Komplementsystem sowie diverse antimikrobielle Peptide und als zelluläre Komponenten verschiedene Entzündungszellen, aber auch Epithelzellen zusammengefasst (siehe auch Tabelle 1-3). Dem gegenüber steht der jüngere adaptive Schenkel (Janeway and al., 2008c), der durch somatisch Gen-Rearrangements von Rezeptoren (Antikörper und T-Zell-Rezeptoren, TCRs) hochspezifische Immunantworten generiert und das immunologische Gedächtnis ausbildet, jedoch zur vollen Ausbildung der Immunreaktion länger benötigt. Die „adaptive Immunität“ basiert humoral auf Antikörpern verschiedener Subklassen und zellulär auf Lymphozyten (v.a. sog. B- und T-Zellen). Die Immunantwort basiert auf dem Zusammenspiel der Komponenten beider Systeme, und obwohl es einige Moleküle und Rezeptoren gibt, die vorzugsweise einem der beiden Schenkel zugeordnet werden können, gibt es nur sehr wenige Komponenten, die ausschließlich innat oder adaptiv sind, sodass die Trennung heute hauptsächlich didaktische, kaum aber biologische Bedeutung hat.

1.2.1 Innate (= angeborene) Immunität

Neben hämatopoetischen Zellen sind Epithelzellen ein unersetzlicher Teil der angeborenen Immunität. Epithelzellen der Haut und insbesondere der Darmmucosa haben als mechano-chemische Barriere den ersten Kontakt zu Pathogenen. Die Bedeutung des Epitheliums wird an genetischen Barrieredefekten deutlich, die mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und atopischer Dermatitis assoziiert sind (Boguniewicz and Leung, 2011; Khor et al., 2011). Oberflächenepithelien produzieren antimikrobielle Peptide (z.B. Lysozym, Defensine), die Pathogene vollständig abtöten (in der Lunge) (Janeway and al., 2008a),

Tabelle 1-3 Die wichtigsten Bestandteile des Immunsystems

	Innate Immunität	Adaptive Immunität
humorale Komponenten	<i>MBL, SLPI, Histatin, Pentraxine, Cathelicidin, Lysozym, Komplement(system), α- & β- Defensine</i>	<i>Antikörper vom A-, D-, E-, G- und M- Typ</i>
zelluläre Komponenten	<i>Epithelzellen, DCs, MΦs, NK-Zellen, Mastzellen, Granulozyten</i>	<i>B- und T- Lymphozyten</i>
wichtige Rezeptoren	<i>C-Typ Lektine, TLRs, RLRs, NLRs, FcRs, KIRs, NCRs, NKG2D, CRs, MHC-Moleküle</i>	<i>BCR, TCR, CD4, CD8</i>
Effektor-moleküle	<i>NO, ROS, Granulysin</i>	<i>Perforin, Granzym B, LT, FasL</i>
Signalstoffe	<i>Typ 1- IFNs, IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, CCL-2, CCL-5</i>	<i>Typ 2-IFN, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-17, IL-21, BLyS</i>

BCR = B-Zell-Rezeptor, BLyS = B-Lymphozyten-Stimulator, CCL = Chemokin vom C-C-Typ, CD = cluster of differentiation, CR = Komplementrezeptor, DC = dendritische Zelle, FcR = Fc-Fragment Rezeptor, IFN = Interferon, IL = Interleukin, KIR = NK-Zell Ig-like Rezeptor, MBL = Mannose-bindendes Lektin, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, Mφ = Makrophage, NCR = NK-Zell-Rezeptor, NKG2D = NK-Zell Gruppe 2, Protein D, NK-Zelle = Natürliche Killerzelle, NLR = NOD-like Rezeptor, NO = Stickstoffoxid, RLR = RIG-I-like Rezeptor, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, SLPI = sekretorischer Leukoprotease-Inhibitor, TCR = T-Zell-Rezeptor, TLR = Toll-like Rezeptor

zahlenmäßig reduzieren (auf der Haut) (Gallo and Hooper, 2012) oder zumindest die Zusammensetzung beeinflussen (im Darm) (Gareau et al., 2010). Auch die Epithelien parenchymatöser Organe haben immunologische Funktionen, so synthetisieren Hepatozyten die meisten Faktoren des Komplementsystems (Pontoglio et al., 2001) und die Akutphaseproteine (Bauer et al., 2013). Diese werden erst als Antwort auf das Eindringen von Pathogenen in den Körper gebildet (Dinarello, 1984), weshalb sie in der Diagnostik der systemischen Infektion und Entzündung großen Stellenwert haben (Gabay and Kushner, 1999). Das Komplementsystem ist dagegen konstitutiv im Blut aktiv. Im Komplementsystem sind drei unterschiedliche Startreaktionen mit einer gemeinsamen Endstrecke angelegt. Der klassische Reaktionsweg verbindet dabei adaptive und innate Immunität, da der Komplementfaktor C1 an das konstante Fragment (Fc) eines Antikörpers bindet. Die C1q-Untereinheit kann manche Oberflächenstrukturen auf Pathogenen direkt binden, diese Reaktion wird aber entscheidend verstärkt, wenn das Pathogen vorher bereits von einem Antikörper erkannt und gebunden wurde, was im Normalfall eine adaptive Immunreaktion voraussetzt. Allerdings sind in diesem Zusammenhang spezielle, sog. „*innate-like lymphocytes*“ (ILL; B1-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen, MZB-Zellen)(Walker et al., 2013) zu nennen. Während der Pool von B2-Zellen (klassische B-Zellen, siehe Kapitel 1.2.2) eine schier unbegrenzte Vielzahl an Antikörpern unterschiedlicher Spezifität herstellt, stellen ILLs ein stark begrenztes Spektrum natürlicher Antikörper her. Während B1-Zellen ihre Antikörper in die Pleura- und Peritonealhöhle sezernieren (Clarke and Arnold, 1998), geben MZB-Zellen in der Milz die Antikörper direkt ins Blut ab (Weill et al., 2009). Natürliche Antikörper, deren Produktion bei wiederholter Pathogenexposition nicht verändert ist (Janeway and al., 2008b), spielen *in vivo* eine besondere Rolle bei der Abwehr von bekapselten Bakterien, z.B. *Streptococcus pneumoniae* (Guinamard et al., 2000). Neben der „klassischen“ Aktivierung des Komplementsystems durch Antikörper gibt es die Möglichkeit der Aktivierung an pathogenspezifischen Oberflächen, z.B. Pilzzellwänden durch Mannose-bindendes Lektin (MBL), ein Mitglied der sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs). Im dritten, alternativen Reaktionsweg bindet spontan gebildetes C3-Komplement eine Oberfläche. Fehlen an dieser Oberfläche körpereigene Inhibitionsmechanismen kommt es zur weiteren Aktivierung. Alle drei Reaktionswege vereinigen sich in der Reaktionskaskade unterhalb von C3 und können dann zwei Funktionen ausüben: Aktives, gebundenes C3 (C3b) wirkt einerseits opsonisierend,

andererseits startet es die gemeinsame Endstrecke, die zur Bildung des Membran-attackierenden Komplexes (MAC) und damit zur Lyse der Zielzelle führt.

Die Phagozytose, also die aktive Aufnahme von Pathogenen, zellulärem Debris oder anderem geformten, extrazellulären Material (Metchnikoff and Binnie, 1905), mit dem Ziel der Elimination dieser Elemente obliegt spezialisierten Zellen, insbesondere Granulozyten (polymorphonukleäre Zellen, PMCs), Makrophagen (MΦs), dendritischen Zellen (DCs) und B-Zellen (Underhill and Ozinsky, 2002), wobei die letzten drei auch als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) zusammengefasst werden. Die Phagozytose von Pathogenen wird durch vorhergehende Opsonisierung erleichtert. Den Phagozyten stehen dafür drei Klassen von Rezeptoren zur Verfügung: die Komplementrezeptoren (CR), von denen es vier verschiedene Subtypen gibt (CR1/CD35, CR2/CD21, CR3/CD11b, CR4/CD11c)(Carroll, 1998), die Fc-Rezeptoren, die den nicht Antigen-bindenden Teil von Antikörpern erkennen und von denen es je Antikörper-Klasse mehrere gibt (Heyman, 2000), sowie *Scavenger*-Rezeptoren (Pluddemann et al., 2007). Diese Rezeptoren werden von den verschiedenen Zellen differenziell exprimiert und ihre Expression wird daher auch zur Identifikation der jeweiligen Zellen herangezogen. Während PMCs die ersten Phagozyten sind, die im Rahmen einer Immunreaktion im Gewebe in großer Zahl eintreffen, Pathogene eliminieren und dann selbst zugrunde gehen (Mayadas et al., 2013), sind MΦs und insbesondere DCs ein entscheidendes Bindeglied zwischen der innaten und der adaptiven Immunität. Diese beiden Zelltypen prozessieren aufgenommenes Material (Blum et al., 2013). Außerdem haben diese Zellen verschiedene Rezeptoren für PAMPs und DAMPs (siehe Abschnitt 1.3), die es ihnen ermöglichen, beim Inhalt ihrer Phagosomen zwischen endogen und ungefährlich sowie exogen und infekt-assoziiert zu unterscheiden. Während nun MΦs vor allem Signale amplifizieren und dadurch pro- oder antientzündliche Mikromillieus schaffen (Weidenbusch and Anders, 2012), präsentieren DCs Antigene für T- und B-Zellen (Neefjes et al., 2011). In Abwesenheit von Gefahrensignalen führt dies zur Toleranzinduktion, bei Vorliegen einer Infektion werden die Lymphozyten „lizenziert“, was den der adaptiven Immunantwort darstellt.

1.2.2 Adaptive (=erworben) Immunität

Als adaptive Immunantwort wird die Antigen-spezifische Produktion von Antikörpern durch spezialisierte, ausdifferenzierte B-Zellen sowie das ebenfalls Antigen-spezifische Abtöten

von körpereigenen, infizierten Zielzellen durch T-Zellen bezeichnet. Während Antikörper, die integraler Bestandteil der B-Zell-Rezeptoren sind, freie Antigene direkt binden können, benötigen T-Zellen für die Bindung ihrer T-Zell-Rezeptoren an die Zielstruktur einen besonderen molekularen Kontext. Die Moleküle werden als humane Leukozyten-Antigene (HLA) bzw. in der Maus als major histocompatibility complex (MHC) bezeichnet. Zytotoxische T-Zellen binden mit Hilfe ihrer CD8-Oberflächenrezeptoren HLA-Moleküle der Klasse I, die von allen Körperzellen außer Erythrozyten exprimiert werden. Die T-Helferzellen erkennen ihre Zielstrukturen im Kontext von HLA/MHC-Molekülen der Klasse II, an die sie mit CD4-Oberflächenmolekülen binden. MHC II-Moleküle werden normalerweise nur von APCs exprimiert und den T-Helferzellen, die selbst nicht direkt zytotoxisch sind, kommt im Rahmen der Immunreaktion eine regulatorische Rolle zu, da sie APCs, die das passende Peptid präsentieren, sowohl aktivieren als auch supprimieren können. Inzwischen sind sieben verschiedene Subtypen von CD4+ T-Helferzellen mit unterschiedlichen Funktionen bekannt: Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Th22-, regulatorische T_{reg} - und follikuläre T_{FH} -Zellen (Baumjohann and Ansel, 2013). Die Funktionen von Th1-, Th2- und Th17-Zellen sind am besten bekannt und liegen jeweils in der Unterstützung der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien und Viren (Th1), gegen Helminthen (Th2) und gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze (Th17), während T_{reg} -Zellen Immunantworten unterdrücken und T_{FH} -Zellen eine entscheidende Rolle in der Unterstützung von B-Zellen für die Antikörperproduktion haben. Über die Funktionen von Th9 und Th22 ist außer der Beteiligung dieser an der Pathogenese der Psoriasis (Akdis et al., 2012) und der Beteiligung jener an der Pathogenese des Asthma bronchiale (Kaplan, 2013) bislang wenig bekannt.

Die hohe Spezifität der adaptiven Immunreaktion basiert auf hochvariablen Rezeptoren, die je nach Zellart als B- oder T-Zell-Rezeptoren (BCRs und TCRs) bezeichnet werden. Die Vielzahl an individuellen Rezeptoren ist in ihrer endgültigen Form genetisch nicht in der Keimbahn gespeichert, sondern entsteht durch genetische Rekombination vorhandener Rezeptorelemente (sog. V(D)J-Kassetten) in individuellen B- und T-Zellen. Auf diese Weise können bis zu 10^9 verschiedene Rezeptoren generiert werden. BCRs und TCRs entstehen parallel zur Differenzierung der B- und T-Zellen (siehe Abbildung 1-4). Die Ausreifung der B-Zellen findet direkt im Knochenmark statt, wo die Stammzellen aller Lymphozyten sich kontinuierlich selbst erneuern. Die T-Zell-Vorläufer wandern vom Knochenmark in den Thymus und reifen dort weiter aus. Die genetische Rekombination, die zur Entstehung der Plethora an BCRs und TCRs führt, ist in vielen Lymphozyten nicht erfolgreich. Die Zellen,

deren Rezeptoren nach Rekombination keine Funktionalität haben, werden durch Apoptose eliminiert. Da ein intakter Rezeptor Voraussetzung für das Empfangen von Überlebenssignalen an die Lymphozyten ist, wird der Vorgang auch als positive Selektion bezeichnet. Davon abzugrenzen ist die negative Selektion: das B- und T-Zellrezeptor-Repertoire darf keine Rezeptoren enthalten, die sich gegen körpereigene Strukturen richten. Die negative Selektion ist in B- und T-Zellen aufgrund der unterschiedlichen Bindungscharakteristika ihrer Rezeptoren unterschiedlich verwirklicht: B-Zellen, die im pathogen-freien Knochenmark mit ihrem BCR eine Antigenbindung zeigen, die über dem für die positive Selektion notwendigen, sehr niedrigen Aktivierungsniveau liegt, können nicht weiter ausreifen. Entweder sie verändern die Spezifität ihres BCR (auch als *receptor editing* bezeichnet) (Nemazee, 2000) oder werden durch Apoptose eliminiert; T-Zellen, bei denen die Rezeptorbindung zellgebunden stattfindet, werden im Thymusmark eliminiert, wenn sie an Zellen binden, die testweise körpereigene Peptide sämtlicher Gewebe präsentieren (Klein et al., 2009). Nach Abschluss der Ausreifung wandern B- und T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe ein, wo sie auf den ersten Kontakt mit den Zielstrukturen ihrer Rezeptoren warten. Findet dieser statt, kommt es im Falle der B-Zellen unter T_{FH}-Zell-Hilfe zur Keimzentrumsreaktion an deren Ende die Entstehung unzähliger Antigen-spezifischer Plasmazellklone oder Gedächtnis-B-Zellen steht, im Falle von der T-Zellen zu deren Aktivierung und damit der Ausführung ihrer Subtyp-spezifischen Funktionen.

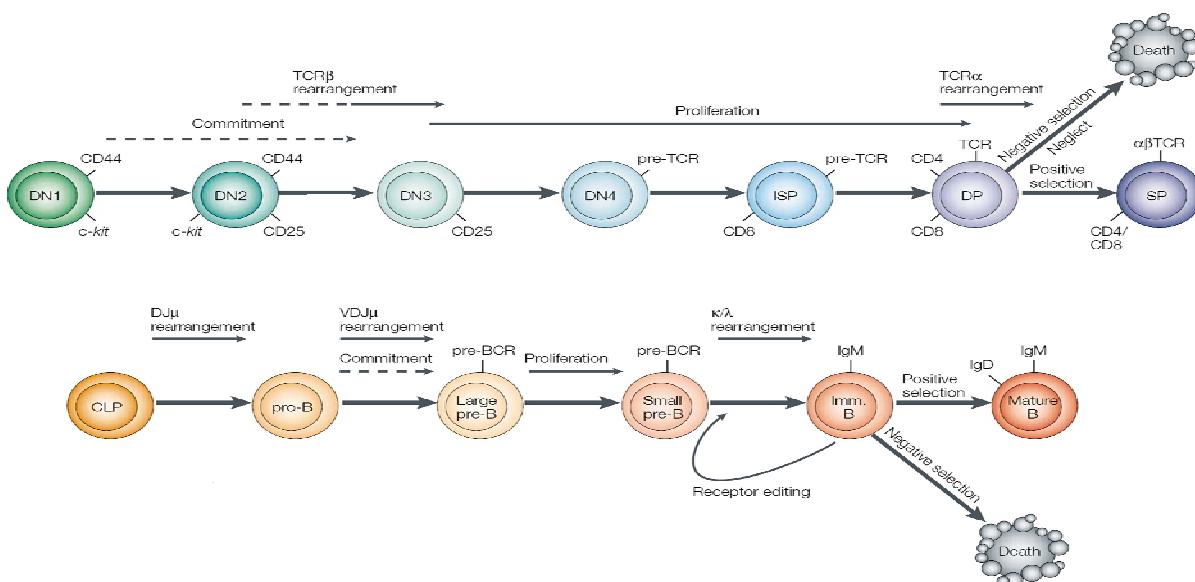


Abbildung 1-4 B- und T-Zellreifung [mod. nach (Engel and Murre, 2001)]

c-kit=Stammzell-Rezeptortyrosinkinase; DN=CD4/CD8 doppelt negativ; CD=cluster of differentiation; Ig=Immunglobulin; κ/λ=Antikörperleichtketten; DJμ=Antikörperschwerketten; CLP=common lymphocyte progenitor; TCR=T-Zell-Rezeptor; ISP=unreife einfache positive T-Zelle; DP=CD4/CD8 doppelt positive T-Zelle; Imm. B= unreife B-Zelle

1.3 Autoimmunität und SLE

1.3.1 Genetisch bedingter Toleranzverlust und Umweltfaktoren

Obwohl die Ätiologie des SLE nur unvollständig verstanden ist, geht man davon aus, dass sich die charakteristische Autoantikörperproduktion gegen Zellkernbestandteile auf dem Boden einer genetischen Suszeptibilität entwickelt. Neben den seltenen Fällen des monogen vererbten SLE (Belot and Cimaz, 2012) haben im vergangenen Jahrzehnt Genom-weite Assoziationsstudien (GWAS) genetische Polymorphismen identifiziert, die überzufällig oft mit dem Auftreten von SLE assoziiert sind. Analysiert man die so identifizierten Proteine (zusammengefasst in Tabelle 1-5) nach Funktionen und Signalwegen, lassen sich im Wesentlichen drei Gruppen erkennen (Liu and Davidson, 2012): 1) Proteine mit Funktionen beim Abbau von Zelldebris und Nukleinsäure-haltigen Immunkomplexen (NS-IKs), 2) Proteine, die in PRR-, IFN- oder andere Zytokinsignalwege involviert sind und 3) Proteine, die in der Aktivierung von B- und/oder T-Zellen eine Rolle spielen. Analog dazu ist das pathogenetische Konzept des SLE: a) durch eine Unfähigkeit des Immunsystems, die

Tabelle 1-5 Lupus-Suszeptibilitätsgene [mod. nach (Deng and Tsao, 2013)]

Funktion		Gen
Innate Immunität	TLR/IFN Signalwege	IRF5,IRF7,STAT4,TLR7,TLR8,IRAK1,ACP5,SPP1
	NF-κB Signalwege	TNFAIP3,TNIP1,PRKCB
	Komplementfaktoren	C1Q,C1R,C1S,C4A,C4B,C2,C3,CFHR3&1,CR2
	Phagozytose	FCGR2A,FCGR3A,FCGR2B,FCGR3B,ITGAM
Immunkomplex- Degradation	DNA-Abbau	TREX1,DNASE1
	Antigenpräsentation	HLA-DR2,HLA-DR3,HLA Klasse III Gene
	T-Zell-Signalwege	PTPN22,TNFSF4,CD44
	B-Zell-Signalwege	BLK,BANK1,LYN,ETS1,PRDM1,IKZF1
Adaptive Immunität	Zytokine	IL-10,IL-21
Epigenetische Modifikation	DNA-Methylierung	MECP2

Milliarden abgestorbener Zellen und deren Kernreste, die Komplement-vermittelt von natürlichen Ak vom IgM-Typ gebunden werden und so NS-IKs bilden, (Ravichandran and Lorenz, 2007) effizient abzubauen, kommt es b) zur Erkennung der DNA- und RNA-haltigen Moleküle und subsequent zur Ausbildung einer pseudo-viralen Immunreaktion (Anders, 2009) mit Typ 1 Interferon-Ausschüttung (Bennett et al., 2003) und parallel c) zum Auftreten von gegen Zellkernbestandteile gerichteten Autoantikörpern aufgrund aberranter B- und T-Zell-Aktivierung (Tsokos, 2011), wodurch (d) ein meist irreversibler Organschaden entsteht. Während unter homöostatischen Bedingungen vor allem Makrophagen für den Abbau apoptotischer Zellen wichtig sind (Lech et al., 2012), spielen z.B. bei Infekten auch Monozyten und Neutrophile eine Rolle (Bosch, 2011). Auch dendritische Zellen phagozytieren Zelldebris und exprimieren Bestandteile dann im Kontext von tolerogenen Signalen, was in T-Zellen entweder Anergie oder eine Differenzierung zu T_{regs} induziert, um so eine Immunantwort gegen Selbstantigene aktiv zu unterdrücken (Steinman et al., 2003). Durch die sterile Entzündungsreaktion werden unter dem Einfluss von PRR- und Zytokinsignalen von den DCs stimulatorische Moleküle exprimiert, die nun T- und auch B-Zellen „lizenziieren“, also eine proentzündliche Differenzierung induzieren (Hivroz et al., 2012). Unter dem Einfluss der aktivierte Th-Zellen und der DCs, die unter anderem den B-Lymphozyten-Stimulator BLyS (Synonym: B-Zell-aktivierender Faktor, BAFF) ausschütten, kommt es zur Plasmazelldifferenzierung von autoreaktiven B-Zellen, die dann große Mengen Autoantikörper produzieren (Hahn, 2013). Die Autoantikörper sind, unter anderem zusammen mit Th17-Zellen und den Effekten der proentzündlichen Zytokine auf das Gefäßendothel, auch entscheidend an der Entstehung der Endorganschäden beim Lupus beteiligt. Bei der Lupusnephritis führen die subendothiale und mesangiale Einlagerung von NS-IKs zur Aktivierung der Endothel- und Mesangialzellen, die in der Folge durch Chemokinproduktion den Influx von pro-entzündlichen Monozyten und T-Zellen triggern, im weiteren Verlauf kommt es durch subepitheliale NS-IK-Einlagerung zur Podozytenapoptose und Proteinurie (Davidson and Aranow, 2010). In der Niere und evtl. auch in anderen Organen führt die Rekrutierung von Th17-Zellen zu einer sterilen Gewebsentzündung (Shin et al., 2011), die über verschiedene Mechanismen parenchymatöse Zellen zerstört (Wallach et al., 2014). In den Gefäßen aller Organe kann es zu zytokin-induzierten Endothelschäden, beschleunigter Atherosklerose und subsequentem hypoxisch-ischämischem Gewebeschaden kommen (Narshi et al., 2011). Durch den so entstehenden Organ- und

Zellschaden kommt es zum erhöhten Anfall von Zelldebris - ein *circulus vitiosus* ist entstanden (Liu and Davidson, 2012).

Aufgrund der zehnfach höheren Inzidenz des SLE bei Frauen wurden Östrogene früh als zumindest Krankheits-modifizierend vermutet. Tatsächlich sind Hormonsubstitution in der Postmenopause bei SLE-Patientinnen mit einer erhöhten Rate an Schüben (Buyon et al., 2005) und erhöhte Östrogenspiegel in der Schwangerschaft mit erhöhter Lupusinzidenz verbunden (Ruiz-Irastorza et al., 1996), doch zeigen sowohl Tiermodelle wie auch klinische Beobachtungen beim Klinefelter- (XXY) und beim Turner-Syndrom (X0) zusätzlich einen Dosiseffekt von X-chromosomal Genen (Smith-Bouvier et al., 2008). Neben der Hormonsubstitutionstherapie sind als Umweltfaktoren insbesondere UV-Exposition (Hahn, 2008), die in 70% der Patienten einen Schub auslöst, Rauchen (Ekblom-Kullberg et al., 2013) und wahrscheinlich eine stattgehabte EBV-Infektion (James et al., 2006) zu nennen. Ebenfalls ist bei den Umweltfaktoren der medikamentös induzierte Lupus zu nennen.

1.3.2 Mechanismen der Immunisierung gegen nukleäre Antigene

Die für den SLE typische Immunisierung gegen Kernantigene basiert auf der Erkennung dieser Moleküle durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs). Eine Übersicht über die verschiedenen PRRs und ihre Funktion im Rahmen der Infektabwehr sowie der Autoimmunität zeigt Tabelle 1.6. Für den SLE als pseudoviralen Entzündungsvorgang sind daher besonders PRRs wichtig, die zur Abwehr von Virusinfektionen dienen. Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) umfasst beim Menschen 9 Mitglieder (Kawai and Akira, 2010). Alle TLRs sind Transmembranproteine, wobei TLR1, TLR2, TLR4 sowie TLR5 an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind und extrazellulär ihre Liganden, sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) detektieren, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 Bestandteil der endosomalen Zellmembran sind, sodass sie PAMPs im Inhalt der Endolysosomen erkennen. Die endosomalen TLRs binden Nukleinsäuren, wobei TLR3 doppelsträngige Ribonukleinsäuren (dsRNA) detektiert, TLR7 sowie TLR8 einzelsträngige Ribonukleinsäuren (ssRNA) und TLR9 unmethylierte Cytosin/Guanin-reiche CpG-Desoxyribonukleinsäuren (DNA) (Kawai and Akira, 2010). Insbesondere TLR7 und TLR9 spielen daher für die Pathogenese des SLE eine Rolle, da ihre Liganden in Zellkernen in großen Mengen vorkommen und daher auch Zielstrukturen der Autoantikörper im SLE sind (Nickerson et al., 2010). Interessant ist auch die Rolle von TLR2

Tabelle 1-6 Verschiedene Familien und wichtige Vertreter der PRRs

Mustererkennungsrezeptor	korrespondierende(s) Pathogen(e)	endogene Liganden
Toll-like Rezeptoren (TLRs):		
TLR2-TLR1 und TLR2-TLR6-Heterodimere	Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Mycobacterium leprae, Borrelia burgdorferi, Neisseria meningitidis, Mycoplasma pneumoniae, Masern, HSV1, Cryptococcus neoformans, Hefepilze	Versican, Biglycan, HMGB1, cardiales Myosin, Urat
TLR4/MD-2/CD14	gramnegative Bakterien, RSV	Biglycan, HMGB1, Fibrinogen, S100-Proteine
TLR5	begeißelte Bakterien	
TLR3	Reoviridae, West Nile Virus, Influenza A, HSV-1	RNA von nekrotischen Zellen
TLR7 (+ TLR8 beim Menschen)	HIV, Influenza-Virus	endogene RNA
TLR9	verschiedene Bakterien, HSV-1, HSV-2, Plasmodien	endogene DNA
RIG-like Rezeptoren (RLRs):		
RIG-I	Flaviviridae	Ubiquitinketten
MDA5	Picornaviridae	
NOD-like Rezeptoren (NLRs):		
NOD1	verschiedene Bakterien	
NOD2	Mykobakterium tuberculosis	
NLRP3	Candida albicans, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Adenoviren, Influenza-Virus	ROS, Harnsäure- und Cholesterinkristalle, ATP
C-Typ Lektine (CLRs):		
MMR (CD206)	Pneumocystis jirovecii, Leishmania donovani, HIV, Influenza-Virus	L-Selectin, lysosomale Hydrolasen
Dectin-1	Hefepilze	Vimentin, T-Zellen
DC-SIGN	Helicobacter pylori, HIV, Candida albicans	IgG
Andere Rezeptoren:		
Scavenger-Rezeptor A	Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Neisseria meningitidis, Enterococcus faecalis, Mykobakterium tuberculosis	AGEs, oxLDL, Aß-Protein, apoptotische Zellreste, Biglycan
Scavenger-Rezeptor B	Plasmodium falciparum	(ox)LDL, APO-Zellen
MARCO	Escherichia coli, Staphylococcus aureus	oxLDL, APO-Zellen, MZBCs
RAGE		AGEs, HMGB1
P2X7		ATP
AIM2	verschiedene Bakterien und DNA-Viren	Doppelstrang-DNA

Zellmembrangebundene PRRs weiß, endosomale PRRs hellgrau und intrazelluläre PRRs dunkelgrau hinterlegt; AGE = advanced glycation end product, AIM2 = absent in melanoma-2, APO-Zellen = apoptotische Zellreste, ATP = Adenosintriphosphat, CD = cluster of differentiation, DC-SIGN = dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DNA = Desoxyribonukleinsäure, HMGB1 = high mobility group protein 1, HIV = humanes Immundefizienzvirus, HSV = Herpes simplex virus, Ig = Immunglobulin, MARCO = macrophage receptor with collagenous structure, MDA5= melanoma differentiation-associated protein 5, MMR = Mannoserezeptor, oxLDL = oxidized low-density lipoprotein, NOD = nucleotide-binding oligomerization domain, NLRP3 = NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, P2X7 = ATP-spezifischer Purinozeptor 7, RAGE = Rezeptor für AGE, RIG-I= retinoic acid inducible gene I, RNA = Ribonukleinsäure

und TLR4, die LPS und andere bakterielle PAMPs erkennen, im Tiermodell die SLE-Pathogenese fördern und damit eine der Grundlagen für die Abhängigkeit des SLE auch von Umweltfaktoren bilden (Lartigue et al., 2009). Neben den TLRs gibt es auch PRRs, die den Intrazellulärraum überwachen und ebenfalls vor allem virale Pathogene erkennen, insbesondere *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I)-like-Rezeptoren (RLRs) (Akira et al., 2006). Nach Ligandenbindung der PRRs startet eine Signalkaskade, an deren Ende die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und damit der Beginn der Immunantwort steht. Die Signalkaskade beinhaltet immer mehrere Adapterproteine zur Signalamplifikation und – regulation und zur Integration von Signalen verschiedener PRRs in einer Zelle. Die wichtigsten Signalwege der PRRs sind in Abbildung 1-7 dargestellt und sollen kurz näher erläutert werden [nach (Kawai and Akira, 2010)]: Alle TLRs besitzen eine intrazelluläre Toll-like/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, die sie, wie in der Abbildung zu sehen, auch mit einigen IL-Rezeptoren teilen. Diese TIR-Domäne ist die Andockstelle für die verschiedenen TLR-Adaptermoleküle *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), *TIR-domain containing adaptor protein* (TIRAP), *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* (TRIF) und *TRIF related adaptor molecule* (TRAM), die ebenfalls eine TIR-Domäne enthalten. Die selektive und zwischen den TLRs unterschiedliche Rekrutierung der Adaptermoleküle kann bereits darüber entscheiden, welche pro-entzündlichen Moleküle am Ende der Kaskade freigesetzt werden. Hierbei führt der MyD88- Signalweg bevorzugt via *IL-1 receptor-associated kinases* (IRAK) 4, IRAK1, IRAK2, *TNF receptor associated factor* (TRAF) 6 und *transforming-growth-factor- β -activated kinase* (TAK1) zur Aktivierung des *nuclear factors κB* (NF-κB) oder verschiedener mitogen-assozierter Proteinkinasen (MAPKs), während der TRIF- Signalweg einerseits via TRAF6 und TAK1 NF-κB aktivieren kann, andererseits aber auch über TRAF3 und *TRAF family member-associated NF-κB activator (TANK-) binding kinase* (TBK) 1 den Interferon-regulatorischen Faktor (IRF) 3. In DCs und MΦs kann MyD88 zusätzlich IRF5 aktivieren, in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs), einem speziellen DC-Subtyp, aktiviert der MyD88- Signalweg auch IRF7. Auch der RLR-Signalweg aktiviert über *IFN-β-promoter stimulator 1* (IPS-1), TRAF3 und TBK1 letztlich IRF3, sodass hier die RLR- und TLR/TRIF- Signalwege konvergieren. CLRs besitzen eine intrazelluläre *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)- Domäne, an die *spleen tyrosine kinase* (SYK) bindet, welches subsequent sowohl NF-κB als auch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) aktivieren kann. Wie bereits erwähnt, gibt es für alle Signalwege auch Inhibitoren, regulatorische Proteine, die den pro-

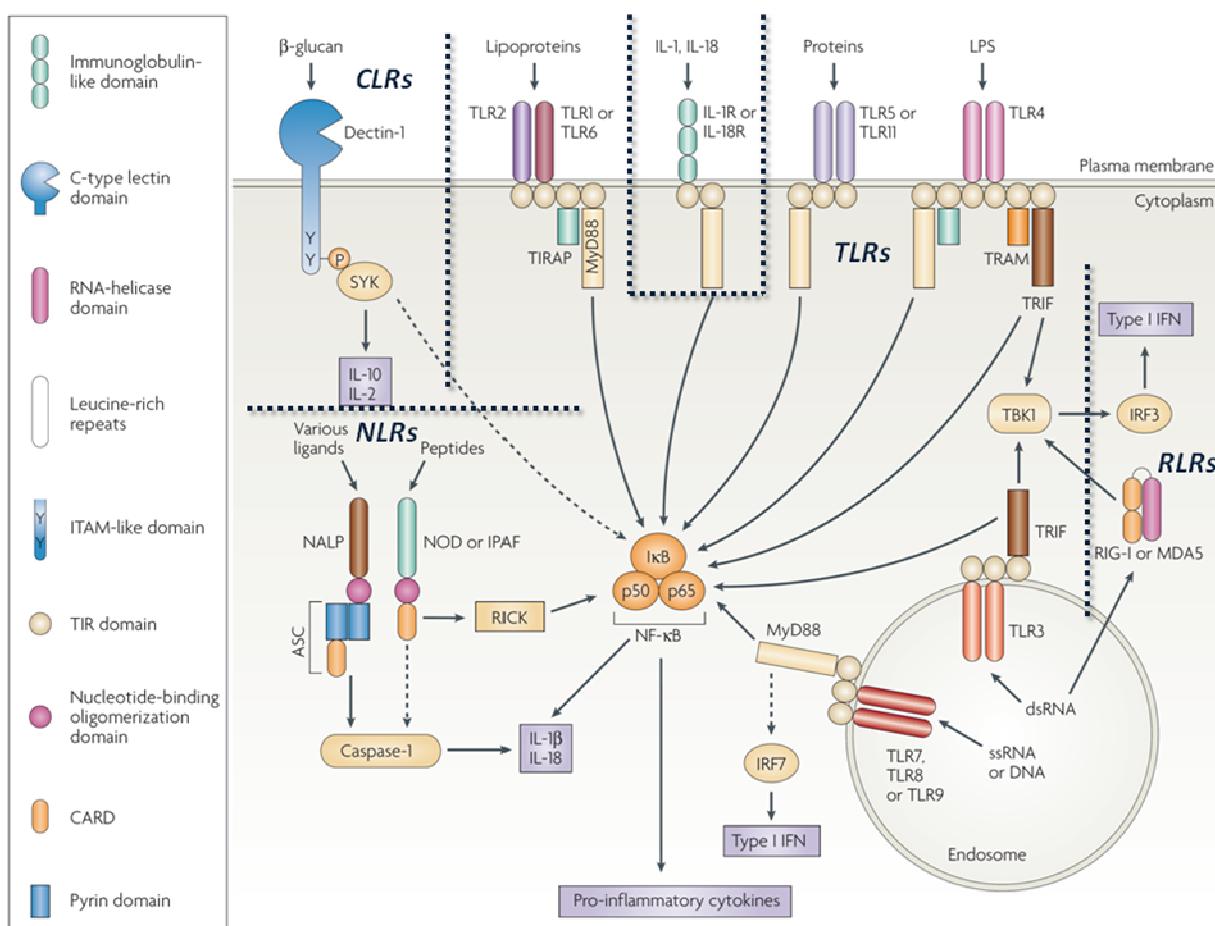


Abbildung 1-7 Signalwege der Mustererkennungsrezeptoren [modifiziert nach (Trinchieri and Sher, 2007)]
 ITAM=Immunorezeptor tyrosin-basiertes Aktivierungsmotif; TIR=Toll/Interleukin-1-Rezeptor; CARD=Caspasen-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomain; IL=Interleukin; SYK=spleen tyrosine kinase; LPS=Lipopolysaccharid

entzündlichen Informationsfluss hemmen und so zur Homöostase beitragen. Insbesondere sind hier für den TLR-NF-κB-Signalweg SIGIRR, TANK, A20, IRAK-M zu nennen (Lech et al., 2011a; Lech et al., 2008). Am Ende der geschilderten PRR-Signalwege steht die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors, seine Translokation in den Zellkern und die Transkription pro-entzündlicher Mediatoren. Die größte Bedeutung haben NF-κB und die Interferon-regulatorischen Faktoren (IRFs) (Honda and Taniguchi, 2006). Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt. Im klassischen Signalweg werden Heterodimere aus zwei nach ihrem Molekulargewicht als p50 und p65 bezeichneten Proteinen gebildet, der so zusammengesetzte NF-κB ist unter homöostatischen Bedingungen an seinen Inhibitor IκB gebunden, kann nicht in den Nukleus translozieren und ist inaktiv. Bei PRR-Aktivierung wird über die beschriebenen Signalwege die IκB-Kinase (IKK) aktiviert, die nun zunächst IκB phosphoryliert. Anschließend kommt es zur Ubiquitylierung von IκB, IκB wird freigesetzt und transloziert in den Nukleus. Dort bindet er das DNA-Motiv 5'-GGGRNNYYCC-3' (N= beliebige Base, R= Purinbase, Y= Pyrimidinbase), die

sogenannte *κB-site* in den Promotoren seiner Zielgene, die dadurch vermehrt transkribiert und subsequent exprimiert werden. Beispiele für Zielgene sind die pro-entzündlichen Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-12p70 und TNF- α sowie Typ 1 Interferone, aber auch die Expression von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche und die Proliferation, insb. von T-Zellen, steigt unter dem Einfluss von NF-κB. NF-κB kann in B- und T-Lymphozyten auch über andere Oberflächenrezeptoren wie den BLyS-Rezeptor, CD27, CD40 oder OX40 aktiviert werden.

1.3.3 Die Familie der Interferon-regulatorischen Faktoren

Die IRFs sind eine Familie von 9 Transkriptionsfaktoren, die ein unterschiedliches Ausmaß an Homologie zueinander aufweisen. Alle IRFs besitzen eine N-terminale DNA-Bindedomäne, welche das auch als *IFN-stimulated response element* (ISRE) bezeichnete DNA-Motiv 5'-AANNGAA-3' bindet. Der C-Terminus der IRFs vermittelt Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren und hat autoregulatorische Funktionen. Gemäß der Homologie der Aminosäuresequenz lassen sich zwei Gruppen bilden: IRF3-IRF9, deren C-Termini starke Ähnlichkeit mit der MH2-Domäne von SMAD-Proteinen haben sowie IRF1 und IRF2, deren C-Termini homolog zueinander sind, sich aber von den restlichen Vertretern unterscheiden. Die verschiedenen IRFs unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen sowie in ihrer Rolle in den PRR-Signalwegen. IRF1 induziert in DCs und MΦs nach Aktivierung über MyD88 (insbesondere im Kontext des TLR-9-Signalweges und bei TNF- α Stimulation) unter anderem IFN- β sowie IL-12p70 und wird dabei von IRF2 inhibiert. IRF3 und IRF7, die beiden IRFs mit der größten Homologie zueinander, können im Rahmen des RLR- und TLR-Signalweges von TBK-1 und IKK phosphoryliert und aktiviert werden, ihre Zielgene sind vor allem Typ 1 Interferone. IRF3 und IRF7 unterscheiden sich dabei im Expressionsmuster; während IRF3 konstitutiv in verschiedenen Zellen vorhanden ist, wird IRF7 nur von B-Zellen, pDCs und Monozyten exprimiert. IRF5 wird im TLR-Signalweg nach MyD88-Bindung aktiviert und phosphoryliert, seine Zielgene sind einerseits die Typ 1 Interferone, andererseits aber auch IL-6, IL-12p70 und TNF- α . Die IRF5-Aktivierung spielt vor allem in DCs und Mφ eine große Rolle. Während die Rolle von IRF6 in PRR-Signalwegen bislang ungeklärt ist, spielt IRF8 eine Rolle in der Induktion von IL-6 und TNF- α , allerdings nicht in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor, sondern indem es NF-κB aktiviert. Der letzte Vertreter der IRF-Familie, IRF9, vermittelt seine Wirkung als *Interferon-stimulated*

gene factor (ISGF) 3 im Komplex mit *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 sowie STAT2, induziert selbst keine Typ 1 Interferone, aber unter anderem IRF7 und ist so Teil eines positiven Rückkopplungskreislaufs. Ebenso wie die PRRs fördern auch deren intrazelluläre Adapter-Moleküle MyD88 (Nickerson et al., 2010) und insbesondere die Interferon-regulatorischen Faktoren IRF1, IRF3, IRF5 und IRF7 (Akahoshi et al., 2008; Fu et al., 2011; Reilly et al., 2006; Richez et al., 2010) die Entstehung des SLE. In Einklang mit diesem Konzept haben Vorarbeiten aus unserem Labor darüber hinaus gezeigt, dass negative Regulatoren der TLR-Signalwege wie SIGIRR oder IRAK-M die Entstehung des SLE im Mausmodell aktiv unterdrücken (Lech et al., 2011a; Lech et al., 2008).

1.4 Die Funktionen von IRF4 im Immunsystem

IRF4 (Synonyme: LSIRF; ICSAT; MUM1; PIP) ist ein Transkriptionsfaktor und wird fast ausschließlich von B- und T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Savitsky et al., 2010). Seine Primärstruktur besteht aus 450 Aminosäuren, das Gesamtprotein hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa (Biswas et al., 2010b). IRF4 besteht aus einer N-terminalen DNA-bindenden Domäne (DBD) (AS 1-134), einer prolinreichen Bindedomäne (AS 134-200), einer Proteininteraktionsdomäne (IAD) (AS 230-420) sowie einer C-terminalen Autoinhibitionsdomäne (AS 420-450) (Marecki and Fenton, 2002). Neben dem oben angesprochenen ISRE- DNA-Bindemotiv bindet IRF4 zwei weitere DNA-Motive: das *Ets/IRF-composite element* (EICE) und das *AP-1/IRF-composite element* (AICE) (Biswas et al., 2010a; Murphy et al., 2013), wobei die DNA-Bindung in diesem Fall von der Interaktion mit einem Partnertranskriptionsfaktor abhängt. Die IRF4-Expression ist in B-Zellen, Mφ und DCs konstitutiv und in T-Zellen durch Antigenstimulation induzierbar (Savitsky et al., 2010). Durch TLR-Stimulation kann die Expression deutlich über das konstitutive Niveau gesteigert werden, Interferone haben hingegen keinen direkten Einfluss auf die IRF4-Expression (Matsuyama et al., 1995). In B-Zellen ist IRF4 entscheidend am Differenzierungsprozess beteiligt (Lu, 2008): Im prä-B-Zellstadium induziert IRF4 die CXCR4-Expression und schwächt gleichzeitig die IL7-Rezeptor-Expression, sodass die prä-B-Zellen im Knochenmark von IL-7 produzierenden zu CXCL-12 produzierenden Stromazellen wandern, die die Leichtkettenexpression der B-Zellen stimulieren (Lazorachak et al., 2006). Das *receptor editing*, ein wichtiger Schritt zur Aufrechterhaltung der B-Zell-Toleranz, wird ebenfalls von IRF4 vermittelt. In unreifen B-Zellen wird IRF4 nach BCR-Aktivierung hochreguliert und induziert sekundäre Gen-Rearrangements des BCRs, um autoreaktive BCRs zu eliminieren (Pathak et al., 2008). Der Antikörperklassenwechsel (*class switch recombination*, CSR) und die Plasmazelldifferenzierung im Rahmen der Keimzentrumsreaktion werden ebenfalls von IRF4 vermittelt. IRF4 induziert das für die CSR wichtige Enzym *activation induced deaminase* und den Plasmazellregulator Blimp-1, sodass in Abwesenheit von IRF4 beide Vorgänge fehlschlagen (Klein et al., 2006; Sciammas et al., 2006). Neben diesen Funktionen in B2-Zellen spielt IRF4 auch in B1-Zellen eine Rolle: Während peritoneale B1-Zellen IRF4-unabhängig natürliche Antikörper sezernieren, ist die Antikörperproduktion von splenischen B1-Zellen bei IRF4-Defizienz stark erniedrigt (Holodick et al., 2010). In T-Zellen hat IRF4 jeweils nicht redundante Rollen in der T-Helferzelldifferenzierung und für die

Effektorfunktion von zytotoxischen und regulatorischen T-Zellen: IRF4 ist notwendig für die IL-4 induzierte Ausreifung von Th2-Zellen (Lohoff et al., 2002). IRF4 induziert nach Phosphorylierung durch ROCK2 die Expression von IL-17 und IL-21 (Biswas et al., 2010b). IRF4-Defizienz blockiert daher die Ausreifung von Th17-Zellen ebenfalls vollständig (Brustle et al., 2007). Auch für die Induktion von Keimzentren durch follikuläre T-Helferzellen ist IRF4 notwendig (Bollig et al., 2012). Nach Antigenstimulation wird IRF4 in CD8+ Effektor-T-Zellen hochreguliert und vermittelt abhängig von der TCR-Affinität die klonale Expansion (Man et al., 2013). IRF4 ist ebenfalls notwendig, um Proliferation und immunsuppressive Kapazität regulatorischer T-Zellen zu erhalten (Cretney et al., 2011). IRF4 spielt daneben auch in der Differenzierung und Funktion von DCs und Mφ eine Rolle: IRF4-Defizienz führt im Mausmodell zum fast vollständigen Fehlen von CD4+CD8- klassischen dendritischen Zellen (cDCs) (Suzuki et al., 2004). In CD8+ cDCs und pDCs, deren Differenzierung IRF4-unabhängig ist (Geissmann et al., 2010), hat IRF4 eine anti-entzündliche Funktion. Über seine IAD bindet IRF4 an MyD88 und tritt dort in Kompetition mit IRF5 (Negishi et al., 2005). Über NOD2-Aktivierung mit Muramyldipeptid kann IRF4 induziert werden und schützt in einem Mausmodell der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) vor TLR-vermittelter Entzündung. Im Umkehrschluss führt IRF4-Defizienz ebenfalls zu einem verstärkt pro-entzündlichen Phänotyp in Mφ (Honma et al., 2005) und DCs (Lassen et al., 2010). In Mφ reguliert IRF4 ausserdem die M2-Polarisation abhängig von der Histondemethylase Jmjd-3 (Satoh et al., 2010). Neben diesen physiologischen Formen spielt IRF4 eine Rolle im Rahmen verschiedener pathologischer Prozesse: Im humanen Setting ist eine t(6;14) Translokation beschrieben, die IRF4 unter die Kontrolle des IgH-Promotors bringt und ein multiples Myelom verursacht (Iida et al., 1997), zusätzlich wird IRF4 in vielen Lymphomen überexprimiert (Tsuboi et al., 2000) und ist mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden (Ito et al., 2002). Insgesamt sind laut NCBI-Datenbank aktuell 580 genetische Polymorphismen (SNPs) des humanen IRF4-Gens bekannt. Ein intronischer SNP korreliert stark mit heller Haut- und Augenfarbe und spricht für eine wichtige Rolle IRF4 in humanen Melanozyten (Praetorius et al., 2013), ein SNP in der 3'-untranslatierten Region von IRF4 ist mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) assoziiert (Di Bernardo et al., 2008). Dieser SNP führt zu deutlich erniedrigter Expression von IRF4 und die Einkreuzung von IRF4-KO Mäusen in ein niederpenetrantes, sporadisches CLL-Mausmodell zum frühen Auftreten von CLL mit 100% Penetranz (Shukla et al., 2013). IRF4-Polymorphismen zeigen in einer chinesischen Kohorte keine Korrelation mit dem Auftreten von SLE (Liu et al., 2013), interessanterweise

ist aber ein SNP im SPI1-Gen, einem IRF4-Partnertranskriptionsfaktor aus der Ets-Familie, mit SLE assoziiert (Hikami et al., 2011). In Mausmodellen konnte ebenfalls die Rolle von IRF4 für verschiedene Autoimmunkrankheiten gezeigt werden: In der experimentellen Autoimmunenzephalitis, einem Modell der multiplen Sklerose (Huber et al., 2013) und in einem CED-Modell (Mudter et al., 2008) waren *Irf4*-defiziente Tiere jeweils vor der Autoimmunpathologie geschützt. Weitere Hinweise auf die Bedeutung von IRF4 liefern Studien mit Mäusen, die für DEF6, ein IRF4-bindendes Protein defizient sind: Diese Tiere entwickeln Symptome des SLE, da DEF6 physiologisch in T-Zellen die Phosphorylierung von IRF4 durch ROCK2 hemmt und bei DEF6-Defizienz spontan Th17-Zellen entstehen, die eine SLE-Pathologie verursachen (Fanzo et al., 2006).

1.5 Forschungshypothese und Zielsetzung

Aktivierende Mutationen im IRF5-Gen erhöhen beim Menschen signifikant das SLE-Risiko (Graham et al., 2007). IRF4 ist über die Inhibition von IRF5 als negativer Regulator in den TLR-Signalweg eingebunden (Negishi et al., 2005) und unterdrückt in einem Modell der sterilen Entzündung in der Niere die APC-Aktivität, sodass IRF4-Defizienz zu deutlich mehr Organschaden und akutem Nierenversagen führt (Lassen et al., 2010). Da APCs eine zentrale Rolle in der Entstehung des SLE fördern, vermuteten wir, dass IRF4 analog zu anderen negativen TLR-Regulatoren die SLE-Entstehung unterdrückt. Da IRF4 fast ausschließlich in Zellen des Immunsystems exprimiert wird, stellt es eine interessante therapeutische Zielstruktur dar. Zusätzlich zur negativen Regulation von TLR-Signalen wird IRF4 zur Ausreifung von B-Zellen und der Differenzierung von CD4+ Th17-Zellen benötigt (Brustle et al., 2007; Klein et al., 2006). Der Nettoeffekt einer IRF4-Depletion auf die SLE-Pathogenese ist daher schwer vorhersagbar. Um die Fragen zu klären, ob 1) IRF4 *in vivo* eine Rolle in der Pathogenese des SLE spielt und, wenn ja, 2) IRF4 die Krankheitsentstehung *in vivo* fördert oder inhibiert, wurden C57/BL6^{*lpr/lrf4-/-*} Mäuse generiert und mit C57/BL6^{*lpr/lrf4+/+*} Mäusen verglichen. Unsere Hypothese war dabei, dass die C57/BL6^{*lpr/lrf4-/-*} Tiere einen agravierten Verlauf des SLE zeigen, weil ihre APCs unter dem ungehemmten Einfluss von IRF5 Autoantigene präsentieren und es so zu einer vermehrten Entzündungsaktivität kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tierversuche

2.1.1.1 Versuchstiere

C57/BL6 ^{lpr} Mäuse	Charles River, Sulzfeld
C57/BL6 ^{lrf4/-} Mäuse	Tak Mak, Toronto

2.1.1.2 Versuchstierzahaltung

Makrolone Typ 2 Käfige	Techniplast, Hamburg
Tierfutter	Sniff Spezialdiäten, Soest

2.1.1.3 Genotypisierung

Proteinase K (20mg/ml)	Merck, Darmstadt
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
NP40	Fluka/Sigma, München
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Fluka/Sigma, München
10x-PE-Puffer (Thermopol Puffer)	New England BioLabs, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt
1,25mM dNTP	Fermentas, St. Leon-Rot
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Fluka/Sigma, München
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Fluka/Sigma, München
Tris	Roth, Karlsruhe
DNA-ladder (kleine Fragmente)	Fermentas, St. Leon-Rot

IRF4-Genotyp Primer Metabion, München

2.1.1.4 Blutentnahme

Isofluran Forene® Abbott, Wiesbaden

Blaubrand® Mikropipetten 20µl Brand, Wertheim

Eppendorf-Gefäße 1,5 ml TPP, Trasadingen, Schweiz

EDTA Biochrom KG, Berlin

2.1.1.5 Organentnahme

RNAlater® life Technologies, Darmstadt

Einbettkassetten NeoLab, Heidelberg

Shandon® Formal-Fixx Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.2 Blut- und Urinuntersuchungen

Kreatinin FS Untersuchungsset DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim

Harnstoff FS Untersuchungsset DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim

Murinalbumin-ELISA-Set Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA

2.1.3 Histologie

Paraffin Merck, Darmstadt

Ammoniumpersulfat (APS) Bio-Rad, München

Xylol Merck, Darmstadt

Ethanol Merck, Darmstadt

Periodic acid-Schiff (PAS)-Reagenz Bio-Optica, Mailand, Italien

Hämatoxylin Merck, Darmstadt

Methanol Merck, Darmstadt

H2O2 BD Biosciences, San Diego, CA, USA

Antigen-Demaskierungslösung Vector, Burlingame, CA, USA

Avidin Vector, Burlingame, CA, USA

Biotin Vector, Burlingame, CA, USA

biotinylierter anti-Maus-IgM-

μ-Ketten-Ziegenantikörper Vector, Burlingame, CA, USA

biotinylierter anti-Maus-IgG-

Ziegenantikörper Vector, Burlingame, CA, USA

Anti-Komplementfaktor9-

Kaninchenantikörper	Mohamed R. Dara, Universität Leiden, Niederlande
Anti-Maus-Mac2-Rattenantikörper	Cederlane, Ontario, Kanada
biotinylierter anti-Kaninchen-	
Ziegenantikörper	Vector, Burlingame, CA, USA
biotinylierter anti-Ratten-	
Ziegenantikörper	Vector, Burlingame, CA, USA
ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, CA, USA
Methylgrün-Färbelösung	Fluka/Sigma, München
Vecta Mount® Einbettmedium	Vector, Burlingame, CA, USA
SuperFrost+® Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
HEp2-2 zellbeschichtete	
Objektträger	Bio-Rad, München

2.1.4 Durchflusszytometrie

(alle Antikörper gegen Maus-Antigene gerichtet)

FACS Plastikkölbchen	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
AF700 -konjugierter anti-B220-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter anti-CD3-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
APC-konjugierter anti-CD4-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PE-konjugierter anti-CD5-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PerCP-konjugierter anti-CD8-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PE-konjugierter anti-CD11b-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PE-konjugierter anti-CD11c-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter anti-CD19-AK	MorphoSys, Langford, UK
FITC-konjugierter anti-CD21-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PE-konjugierter anti-CD23-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PerCP-konjugierter anti-CD25-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter anti-CD40-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
APC-konjugierter anti-CD43-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
APC-konjugierter anti-CD138-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
FITC-konjugierter anti-CD206-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
AF700-konjugierter anti-F4/80-AK	MorphoSys, Langford, UK
PE-konjugierter anti-IgM-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

FITC-konjugierter anti-IgD -AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
APC-konjugierter anti-MHCII-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
APC-konjugierter anti-NK1.1-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Anti-FOXP3- Flow Set	BioLegend, San Diego, CA, USA
PE-konj. anti-Igκ-Leichtketten-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PE -konjugierter anti-IL-17a-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
PE-konjugierter anti-IFN-γ-AK	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
CALTAG Counting beads	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.1.5 Zellkulturversuche

Ficoll-Paque PREMIUM	GE Healthcare, Freiburg
1ml, 2ml, 5ml, 10 ml Spritzen	B. Braun Melsungen, Melsungen
24 G Kanülen	B. Braun Melsungen, Melsungen
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
BD Falcon® Zellfilter 70 µm	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Präseparationsfilter 30 µm	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
magnetkonjugierte anti-Maus-	
CD11c-Rattenantikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
magnetkonjugierte anti-Maus-	
CD19-Rattenantikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
magnetkonjugierte anti-Maus-	
CD45-Rattenantikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
6-Kammer-Zellkulturplatte	Costar Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
24-Kammer-Zellkulturplatte	Nunc, Wiesbaden
96-Kammer-Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
LPS	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Imiquimod	Invivogen, Toulouse, Frankreich
CpG	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Flt-3	Immunotools, Friesoyth

2.1.6 ELISA-Materialien

Nunc Maxisorp® ELISA-Platte	Nunc, Wiesbaden
Maus IL-4-ELISA-Ready-Set-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Maus IL-6-ELISA-Set OptEIA™	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IL-10-ELISA-Set OptEIA™	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IL-12p40-ELISA-Set OptEIA™	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IL-17a-ELISA-Set	BioLegend, San Diego, CA, USA
Maus IL-21-ELISA-Ready-Set-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Maus IL-23-ELISA- Ready-Set-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Maus CCL2-ELISA-Set OptEIA™	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IFN γ -ELISA-Set OptEIA™	BD Biosciences, Heidelberg
Maus TNF α -ELISA-Set	BioLegend, San Diego, CA, USA
Maus Albumin-ELISA-Set	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Maus IgG-Quantifizierungsset	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Maus IgM- Quantifizierungsset	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
HRP-konjugierter anti-Maus-IgG-	
Ziegenantikörper	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
HRP-konjugierter anti-Maus-IgM-	
Ziegenantikörper	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Poly-L-Lysin	Trevigen, Gaithersburg, MD, USA
murine dsDNA	Metabion, Martinsried
Smith Antigen	Zycomed Systems, Berlin
TMB-Substrat Reagenzset	BD Biosciences, Heidelberg
1M H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe

2.1.7 Reverse Transkriptase-quantitative Polymerasenkettenreaktion

2.1.7.1 RNA-Isolation

PureLink® RNA Mini Kit	ambion, Darmstadt
RNAse-freies DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
100 % Ethanol	Merck, Darmstadt

2.1.7.2 cDNA-Synthese

5x FS Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
25 mM dNTPs	GE Healthcare, München
0,1 M Dithiothreitol	Invitrogen, Karlsruhe
lineares Acrylamid	ambion, Darmstadt
Hexanucleotid-Mix	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka/Sigma, München
RNAsin	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase „SS-II“	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7.3 quantitative Polymerasekettenreaktion

LightCycler® 96-Kammer-Platte	Roche, Mannheim
10x-Taq-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
25 mM dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
PCR-Optimierungsreagenz	Bitop AG, Witten
Bovines Serumalbumin	Fermentas, St. Leon-Rot
SYBRgreen I	Fluka/Sigma, München
25 mM MgCl2	Fermentas, St. Leon-Rot
300 nM PCR-Primer	metabion, Martinsried

2.1.8 Basischemikalien

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

2.1.9 Primersequenzen

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC
ARG1	AGAGATTATCGGAGCGCCTT	TTTTTCCAGCAGACCAGCTT

BAFF	CCTCCAAGGCATTCCTCTT	GACTGTCTGCAGCTGATTGC
BCL2	GATCCAGGATAACGGAGGCT	GGTCTTCAGAGACAGCCAGG
BCL6	AGTTTCTAGGAAAGGCCGGA	ACTAGCGTGCCGGTAAACT
PRDM1/BLIMP1	ACCAAGGAACCTGCTTTCA	TAGACTTCACCGATGAGGGG
CCL2/MCP1	CCTGCTGTTCACAGTTGCC	ATTGGGATCATCTGCTGGT
CCL5/RANTES	CCACTTCTTCTCTGGGTTGG	GTGCCACGTCAAGGAGTAT
CCR2	AGGCATCCATTTGCTTCTG	CAACTCCTCATCAGGCACA
CCR5	GCAGGGTGCTGACATACCAT	ATCCGTTCCCCCTACAAGAG
Cdkn1a	ATCACCAAGGATTGGACATGG	CGGTGTCAGAGTCTAGGGGA
Cdkn1b	TCTGACGAGTCAGGCATTG	CAGAACATAAGCCCCTGGA
Cdkn1c	TTCTCCTGCGCAGTTCTCTT	CTGAAGGACCAGCCTCTCTC
CXCL2/MIP2	CGGTCAAAAAGTTGCCTTG	TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC
CXCL10/IP10	GGCTGGTCACCTTCAGAAG	ATGGATGGACAGCAGAGAGC
CXCL12/SDF1	GCGCTCTGCATCAGTGAC	TTTCAGATGCTTGACGTTGG
CXCR4	ACTCACACTGATCGGTTCCA	AGGTGCAGGTAGCAGTGACC
Fizz1/ Retnla	CCCTTCTCATCTGCATCTCC	CTGGATTGGCAAGAAGTTCC
Gata3	ATCCTGTAATGGCTTGTGGG	AGGATGTCCTGCTCTCCTT
IFIT1	CAAGGCAGGTTCTGAGGAG	GACCTGGTCACCATCAGCAT
IFN-β	CCCTATGGAGATGACGGAGA	CCCAGTGCTGGAGAAATTGT
IL10	ATCGATTCTCCCTGTGAA	TGTCAAATTCAATTGACCT
IL12	CTAGACAAGGGCATGCTGGT	GCTTCTCCCACAGGAGGTTT
IL4	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT
IL6	TGATGCACTTGCAGAAAACA	ACCAGAGGAAATTTCATAGGC
NOS2/iNOS	TTCTGTGCTGTCCAGTGAG	TGAAGAAAACCCCTTGCT
IRF4-KO	CCGGTGCCCTGAATGAACTGC	CAATATCACGGGTAGCCAACG
IRF4-WT	GCAATGGAAACTCCGACAGT	CAGCGTCCTCCTCACGATTGT
MRC1	ATATATAAACAAAGAATGGTGGCAGT	TCCATCCAAATGAATTCTTATCC
MX1	TCTGAGGAGAGGCCAGACGAT	CTCAGGGTGTGATGAGGTC
Tbet	TCAACCAGCACCAGACAGAG	ATCCTGTAATGGCTTGTGGG
TGF-β	GGAGAGCCCTGGATACCAAC	CAACCCAGGTCCCTCCTAA
TLR7	GGATGATCCTGGCTATCTC	TGTCTCTCCGTGTCCACAT
TLR9	CAGTTGTCAGAGGGAGCCT	CTGTACCAGGAGGGACAAGG

TNF-α	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	CCACCACGCTCTCTGTCTAC
Ym1/Chi3I3	TCTGGGTACAAGATCCCTGAA	TTTCTCCAGTGTAGCCATCCTT

2.1.10 Geräte

2.1.10.1 ELISA-Geräte

ELISA-Lesegerät Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA-Platten Spüler ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall

2.1.10.2 Zellkultur

Sterilwerkbank Class II, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, ME, USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellinkubator Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, Osterode
MidiMACS-Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.10.3 Durchflusszytometer

FacsCalibur™ Durchflusszytometer	BD Bioscience, Heidelberg
Homogenisator Ultra Turrax T25	IKA GmbH, Staufen

2.1.10.4 Mikrotom und Mikroskopie-System

Schneidgerät Jung CM 3000	Leica, Solms
Lichtmikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems, Wetzlar
Lichtmikroskop Leica Wild MPS52	Leica Microsystems, Wetzlar
Digitale Kamera DC 300F	Leica Microsysteme, Cambridge, UK

2.1.10.5 Nukleinsäure-Analysen

Thermoschüttler UNO-II	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Photometer DU 530	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Photometer Ultrospec 1000	Amersham, Freiburg
PCR-Gel-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
LightCycler 480 PCR-Gerät	Roche Diagnostics, Mannheim
Rotilabo®-Mikropistill	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.10.6 Zentrifugen

Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg

2.1.10.7 Waagen

Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen

2.1.10.8 Sonstige Geräte

Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Pippeten Pipetman® P	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen
pH meter WTW	WTW GmbH, Weilheim
Wasserbad HI1210	Leica Microsystems, Solms

2.1.10.9 Software

Acrobat Writer	Adobe Systems, Dublin, Ireland
CellQuest	BD Biosciences, Heidelberg
Endnote x4	Thomson-Reuters, New York, NY, USA
Office 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
QWin	Leica Microsystems, Wetzlar
Windows XP Professional	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

2.2.1.1 Generierung der C57/Bl6^{Ipr}, C57/Bl6^{IRF4-/-} und der C57/Bl6^{Ipr/IRF4-/-} Mäuse

Die Zucht von C57/Bl6^{Ipr} Mäusen wurde 1978 beschrieben (Andrews et al., 1978), die Mäuse sind heute kommerziell erhältlich und für die vorliegende Arbeit wurden die Zuchtpaare von den Charles River Laboratories bezogen. C57/Bl6^{IRF4-/-} Mäuse wurden von Hans-Willi Mittrücker 1997 im Labor von Tak Mak in Toronto generiert (Mittrucker et al., 1997) und von Tak Mak freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Durch Verpaarung dieser beiden Mauslinien wurden zunächst sowohl für die Fas^{Ipr} Mutation als auch den IRF4-KO heterozygote Mäuse generiert. Durch erneute Verpaarung entstanden Fas^{Ipr}-homozygote C57/Bl6^{Ipr/IRF4-/-} Tiere. Diese wurden als Zuchtpaare verwendet, da C57/Bl6^{Ipr/IRF4-/-} Mäuse Tiere unfruchtbar sind. Die Genotypfrequenzen des Nachwuchses der IRF4-heterozygoten Tiere entsprach den Mendel'schen Regeln (IRF4^{-/-} vs. IRF4^{+/-} vs. IRF4⁺⁺ wie 1:2:1), wobei die Tiere äußerlich nicht zu unterscheiden waren. Nach Genotypisierung wurden ausschließlich weibliche Tiere des Genotyps IRF4^{-/-} und IRF4⁺⁺ für die Versuche verwendet, während sowohl männliche wie weibliche IRF4^{+/-} Mäuse nach Bedarf zur Aufrechterhaltung der Zucht verwendet wurden.

2.2.1.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung selbst basiert auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986), die PCR wiederum basiert hauptsächlich auf zwei Prinzipien: 1) DNA, die normalerweise doppelsträngig vorliegt, hat, abhängig von ihrer Basenzusammensetzung, einen Schmelzpunkt, ab dem sie zur Hälfte und mit höheren Temperaturen dann zunehmend mehr einzelsträngig vorliegt und 2) es gibt DNA-abhängige DNA-Polymerasen, die extrem hitzestabil sind, also durch die zur DNA-Linearisierung notwendigen Temperaturen nicht denaturiert werden, sondern ihre enzymatische Aktivität erhalten (z.B. die Taq-Polymerase). Daraus resultiert die Möglichkeit, in einem Reaktionsansatz die Taq-Polymerase, eine beliebig kleine Menge DNA (im Extremfall ein DNA-Molekül), einen Überschuss an Nukleotiden sowie sogenannte Primer (mehrere Basen lange einzelsträngige DNA-Stücke, auch als Oligonukleotide bezeichnet) zu vereinen und dann 1. die DNA durch

Temperaturerhöhung zu linearisieren, 2. bei niedrigerer Temperatur von der Taq-Polymerase an den beiden erhaltenen Einzelsträngen den Komplementärstrang synthetisieren zu lassen und dann 3. Schritt 1 und 2 iterativ zu wiederholen. Die Menge generierter DNA steht zur Ausgangsmenge dabei im Verhältnis 2^n (mit n als Anzahl der Iterationen). Da die Taq-Polymerase zum Synthese-Start die komplementär an den DNA-Einzelstrang bindenden Oligonukleotide zwingend benötigt, können so auch spezifische DNA-Stücke durch spezifisch bindende Primer amplifiziert werden. Werden nun Primer gewählt, die entweder für ein Gen oder in der Knock-out (KO) Situation für die neue genomische Landschaft an der Stelle, wo normalerweise das ausgeschnittene Gen liegt, spezifisch sind, kann die PCR zur Genotypisierung genutzt werden, da die nachweisbare Amplifikation eines DNA-Abschnitts vom Genotyp abhängt.

Nach Ohrloch-Markierung der Mäuse zur späteren Zuordnung der Genotypsierungs-ergebnisse wurde zunächst allen Mäusen 2mm Gewebe an der Schwanzspitze entnommen und mit 200 μ l PBND-Puffer (2,5ml 2M KCl, 1ml 1M Tris-HCl (pH8,3), 0,25ml 1M MgCl₂, 10ml 0,1% Gelatine, 0,45ml 100% NP-40, 0,45ml 100% Tween-20; H₂O ad 100 ml) sowie 1 μ l Proteinkinase K (20 mg/ml) 4 Stunden bei 56° C schüttelnd inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Nach kurzer Zentrifugation (12.000 rcf x 2 min) wurde der Überstand mit der nun freien DNA der Tiere abpipettiert. Für die sich nun anschließende, eigentliche PCR wurde ein Mastermix angesetzt, der aus 2,5 μ l 10x-PE-Puffer, 2,0 μ l 1,25mM dNTP, 0,5 μ l Taq-DNA-Polymerase und 17,0 μ l H₂O bestand. Dem zugesetzt wurden dann 1 μ l des DNA-haltigen Gewebelysates sowie entweder 2 μ l des IRF4-Wildtyp oder des IRF4-KO Primer-Paares (jeweils 1 μ l 10 pM Primer), sodass sich pro Tier zwei PCR-Ansätze à 25 μ l ergaben. Zusätzlich wurden auch Ansätze mit DNA eines bereits bekannten Genotyps als Positiv- und mit reinem Wasser als Negativkontrollen mitgeführt. Nach einer Präinkubationszeit von 15 Minuten bei 94°C zur initialen DNA-Linearisierung wurde der PCR-Zyklus wie folgt eingestellt: 30 Sekunden bei 94°C, 60 Sekunden bei 61°C (Primerbindung), 90 Sekunden bei 72°C (DNA-Synthese durch Taq-Polymerase), 30 Iterationen. Abschließend wurde 10 Minuten bei 72°C inkubiert, sodass die Taq-Polymerasen sämtliche DNA-Einzelstränge komplettieren können. Nach Abschluss der PCR wurden je 4 μ l eines PCR-Ansatzes mit 4 μ l 6x Ladepuffer (3ml Glycerol; 0,5ml 5% Bromphenolblau; 0,5ml 5% Xylencyanol; H₂O ad 6ml) vermischt und dieses Gemisch je in eine Taschen eines Agarosegels (2 g Agarosepulver in 100ml TBE-Puffer kochen, dann 8 μ l 1% Ethidiumbromid zugeben und in Gussform mit

Taschenkamm erkalten lassen) gegeben. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einem Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Länge (*DNA-ladder*) gefüllt, um nach der Elektrophorese die Größe der durch die PCR amplifizierten Fragmente abzuschätzen. An das in TBE-Puffer (108 g Tris; 55 g Borsäure; 5,84 g EDTA; H₂O ad 10 l) eingelegte Agarosegel wurde dann für ca. 30 Minuten eine Spannung von 200 V angelegt. Die negativen Ladungen des DNA-Rückgrats führen dazu, dass die DNA-Fragmente im Spannungsfeld zum Pluspol wandern, wobei kleine Fragmente aufgrund des geringeren Widerstandes im Gel schneller wandern als große. Ist die Wanderung, die durch den bläulichen Ladepuffer im Gel direkt begutachtet werden kann, weit genug fortgeschritten, haben sich kleine und große Fragmente soweit getrennt, dass eine gute Unterscheidung möglich ist und anhand der *DNA-ladder* auch die Größe eines Fragmentes bestimmt werden kann. Das ins Gel eingegossene Ethidiumbromid, das sich während der DNA-Wanderung in die Doppelhelices interkaliert, wird hierzu mit UV-Licht sichtbar gemacht. Je nach Bandenmuster kann der Genotyp bestimmt werden: Fragment nur im IRF4-Wildtyp-PCR-Ansatz -> IRF4^{+/+}, Fragment nur im IRF4-KO-PCR-Ansatz -> IRF4^{-/-}, Fragmente in beiden Ansätzen -> IRF4⁺⁻.

2.2.1.3 Tierhaltung

Alle Tiere wurden in autoklavierten Käfigen mit Sterilfilterdeckel pathogen-frei unter einem zwölfständigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei freiem Zugang zu Trinkwasser und Futtermittel in Gruppen von maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten. Futtermittel, Trinkwasser, Einstreu und Nestwatte wurden im Autoklaven sterilisiert und bei Bedarf, spätestens aber nach 7 Tagen gewechselt. Sämtliche experimentellen Verfahren wurden in vollem Einklang mit den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch die Regierung von Oberbayern vorab genehmigt.

2.2.1.4 Eingriffe

Da die Intervention in der vorliegenden Doktorarbeit in der Ausschaltung des IRF4-Gens in der Keimbahn und damit in allen Körperzellen von C57/Bl6^{lpr} Mäusen bestand, waren außer der Genotypisierung an den lebenden Tieren keine weiteren Eingriffe nötig. Im Alter von 24 Wochen wurden die weiblichen Versuchstiere schonend mit auch bei Menschen angewandtem Isofluran-Narkosegas betäubt. Durch sanften suprapubischen Druck konnte dann Urin aus der Blase entleert und in einem Eppendorfgefäß aufgefangen werden.

Anschließend wurde den Tieren mittels feinen Glaskapillaren retro-orbital Blut entnommen. Nach Abschluss der Blutentnahme (ca. 1,5 ml) in vorher mit 50 µl 0.5 M EDTA befüllten Eppendorfgefäßeln wurden die Versuchstiere dann in immer noch tiefer Narkose durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.1.5 Gewebeentnahme

Direkt nach der zervikalen Dislokation wurden die Tiere auf einer Werkbank unter konstanter Luftsaugung mit Pins auf einer sauberen, desinfizierten Unterlage befestigt, ausgiebig mit Desinfektionsmittel besprüht und anschließend thorako- und laparotomiert. Dann wurden unter sterilen Kautelen Lungen, Nieren und Milzen der Tiere entnommen und in Zellkulturschalen auf Eis in PBS zwischengelagert. Die Lungen wurden in komplett in histologischen Einbettkassetten verpackt und dann in 10% Formalin über Nacht fixiert. Die Nieren wurden gedrittelt, wobei ein Drittel ebenfalls sofort in Einbettkassetten in 10% Formalin über Nacht fixiert wurde, das zweite Drittel für spätere mRNA-Expressionsanalysen zum Schutz vor endogenen RNAsen in mit RNA-later Konservierungsmedium befüllten Eppendorfgefäßeln bei -20°C eingefroren wurde und das letzte Drittel ebenfalls in Eppendorfgefäßeln bei -70°C zur späteren Anfertigung von immunhistologischen Schnittpräparaten eingefroren wurde. Die Milzen der Tiere wurden entweder in zwei Hälften geteilt, wobei jeweils eine Hälfte für mRNA-Analysen und Immunhistochemie verwendet wurden, oder en bloc für die Generierung von Splenozyten-Einzelzellsuspensionen verwendet. Nach Abschluss der Organentnahme wurden die Vorder- und Hinterläufe der Tiere proximal exartikuliert und die Haut von den Extremitäten abgetrennt. Die Extremitäten wurden dann in RPMI mit 10% FCS und 1 % P/S in Zellkulturschalen gelegt, luftdicht verschlossen und aus einer sterilen Werkbank transferiert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Splenozytenkultur

Die entnommenen Milzen wurden auf eine sterile Werkbank überführt, wo sie in mit RPMI+10%FCS+1%P/S gefüllten Zellkulturschalen auf Eis zunächst in kleinere Stücke zerteilt und dann mit dem Stempel einer 10ml Spritze durch ein Zellsieb der Porengröße 70 µm in 50ml Falcon-Plastikkolben gedrückt, wobei das Sieb ausgiebig mit Zellkulturmedium

nachgespült wurde. Anschließend erfolgte 5 Minuten eine Zentrifugation bei 1400 rcf und 4°C für 5 Minuten. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml 0,3 M NH4Cl resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert, um kontaminierende Erythrozyten zu lysieren. Nach Zugabe von 10 ml PBS wurde erneut 5 Minuten bei 1400 rcf und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Nach diesem Waschschritt erfolgte eine letzte Zentrifugation (gleiche Parameter), das Pellet wurde dann in 5 ml RPMI+10%FCS+1%P/S (Vollmedium) resuspendiert und die Zellkonzentration wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.2.2 Aus dem Knochenmark induzierte dendritische Zellen (BMDCs)

Auf einer sterilen Werkbank wurde das restliche Muskelgewebe von den vorher entnommenen Extremitäten abpräpariert. Dann wurde die Markhöhle eines jeden Knochen mit einer 24 G Kanüle anpunktiert und darüber das Knochenmark mit ca. 2ml eisgekühltem Vollmedium in eine sterile Zellkulturschale gespült. Durch mehrfache Aspiration mit einer 1000 µl Pipette wurde eine homogene Zellsuspension hergestellt, die dann in 15 ml Falcons bei 1400 rcf 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert wurde. Es erfolgte eine Erythrozytenlyse mit NH4Cl und ein Waschschritt (beides wie oben beschrieben), sodann die Resuspension in Vollmedium. Nach einer Zellzählung wurden die Zellen auf 12-Kammer-Zellkulturplatten verteilt, wobei jede Kammer mit $0,5 \times 10^6$ Zellen, 1,5 ml Vollmedium und GM-CSF in einer Endkonzentration von 100 ng/ml befüllt und dann für 8 Tage bei 37°C und 5 % CO2 inkubiert wurden (nach 4 Tagen Zugabe von 1 ml Frischmedium, am 8. Tag Medienwechsel). Unter diesen Bedingungen differenzieren Knochenmarksvorläuferzellen zu konventionellen, nicht aber zu plasmazytoiden dendritischen Zellen (Xu et al., 2007). Die so aus Knochenmark generierten Zellen wurden nicht weiter phänotypisiert und sollen hier als BMDCs (*bone marrow derived dendritic cells*) bezeichnet werden.

2.2.2.3 Mononukleäre Zellen aus dem Blut (PBMCs)

Die Gewinnung von PBMCs erfolgte aus dem EDTA-Vollblut nach der Ficoll-Gradienten-Methode (Boyum, 1964). Hierzu wird 1 ml EDTA-Vollblut mit 1 ml PBS gut vermischt und dann vorsichtig auf 1,5 ml vorgelegte Ficoll-Paque Lösung in ein 15ml Falcon pipettiert, ohne dass sich das Blut-PBS Gemisch und die Ficoll-Lösung vermischen. Dann wird das Falcon für 40 Minuten bei 400 rcf und 20°C zentrifugiert. Am Ende haben sich durch die Gradienten-

Zentrifugation mehrere Schichten gebildet. Die oberste Schicht enthält Plättchen-reiches Blutplasma, das entweder verworfen oder für spätere Analysen ebenfalls asserviert werden kann. Die zweite Schicht enthält die PBMCs, nach Herstellerangaben bei der Maus insbesondere Lymphozyten. Die dritte Schicht ist die Ficoll-Lösung, die die PBMCs von den Granulozyten und Erythrozyten der vierten Schicht trennt. Die PBMCs wurden vorsichtig mit einer 1 ml Pipette abgesaugt, in einem weiteren Zentrifugationsschritt mit PBS gewaschen (siehe oben) und dann in Vollmedium resuspendiert.

2.2.2.4 Zellstimulationsexperimente

Für die Zellstimulationsexperimente wurden entweder frisch gewonnene Splenozyten oder PBMCs von C57/Bl6^{Ipr/IRF4/+} und C57/Bl6^{Ipr/IRF4/-} Mäusen verwendet, oder deren nach 8 Tagen ausdifferenzierten BMDCs. In den ersten beiden Fällen wurden 24-Kammer-Zellkulturplatten mit jeweils 10^6 Zellen in 1ml Medium pro Kammer verwendet, bei den BMDCs wurden wie oben erwähnt 12-Kammer-Zellkulturplatten verwendet. In beiden Fällen kamen zur Zellstimulation TLR-Liganden in folgender Konzentration zur Anwendung: Lipopolysacharid (LPS) 1 µg/ml, Imiquimod (Imi) 1µg/ml, unmethylierte CpG-reiche B-DNA (CpG) 1µg/ml. Als Kontrolle wurde Zellkulturmedium verwendet. Nach Zusetzung der Stimulatoren bzw. der Kontrolle in die Zellkammern (bei BMDCs und PBMCs als Dupletten, bei Splenozyten als Tripletten) wurden die Zellkulturplatten 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet und dann die Zellkulturüberstände abpipettiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.3 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Als *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wird ein hochsensitives Testverfahren bezeichnet, das dem Nachweis von Molekülen verschiedener Klassen (z.B. Proteine, Toxine, Medikamente etc.) dient, wobei der Test auf der hohen Spezifität von Antikörpern für ihr jeweiliges Antigen basiert. Grundsätzlich gibt es verschiedene Arten von ELISAs, hier soll aber vor allem auf den, in dieser Doktorarbeit hauptsächlich verwendeten, sogenannten „sandwich ELISA“ eingegangen werden. Dabei werden grundsätzlich die Kammern z.B. einer 96-Kammer-Platte in einem speziellen Puffer (*coating buffer*) mit einem Antikörper, der für das jeweilige Analysat hochspezifisch ist (*capture antibody*), meist über Nacht inkubiert,

sodass dieser Antikörper fest mit der ELISA-Platte verbunden wird. Nach dieser Inkubation werden die Kammern mehrfach gewaschen, sodass nur der mit der Platte verbundene Antikörper in den Kammern zurückbleibt. Um nun eine unspezifische Bindung des Analysats und insbesondere anderer Moleküle an den Antikörper oder die Platte zu verhindern, werden die Kammern nun z.B. mit bovinem Serumalbumin (BSA) oder fötalem Kälberserum (FCS) inkubiert, sodass die potentiellen, unspezifischen Bindestellen mit BSA besetzt werden (*blocking*). Nach diesem Inkubationsschritt muss nicht gewaschen werden, nach Verwerfen der Inkubationslösung kann nun direkt die Probe mit dem Analysat in die Kammern gegeben werden. Das Analysat wird in der nun folgenden Inkubation hochspezifisch vom *capture antibody* gebunden. Nach Abschluss dieses Inkubationsschrittes werden die Kammern wieder gewaschen. Im Anschluss folgt jetzt wieder eine Inkubation mit einem ebenfalls für das Analysat hochspezifischen Antikörper (*detection antibody*), wobei dieser ein anderes Epitop des Analysats als der *capture antibody* erkennt. Die sich nun vom Plattenboden ergebende Anordnung von Erstantikörper (*capture*) – Analysat – Zweitantikörper (*detection*) ist dabei die namensgebende Besonderheit des „sandwich ELISAs“. Zusätzlich ist der *detection antibody* biotinyliert und die Inkubation erfolgt im Beisein eines an Streptavidin gebundenen Enzyms (meist die Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*, HRP). Aufgrund der ebenfalls sehr spezifischen und sehr starken Biotin-Streptavidin-Bindung ist jedes Analysat-Molekül am Ende der Inkubation über den *detection antibody* mit einem oder mehreren HRP-Enzymen verbunden (*enzyme-linked*). Nach einem letzten, sehr ausführlichen Waschschritt werden die Kammern abschließend mit einer 1:1 Mischung aus Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), einem chromogenen Substrat der HRP, beschickt. Bei der Peroxidase-Reaktion dient TMB als Elektronendonator, wobei TMB zu 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin oxidiert wird, dessen Konzentration photometrisch nach Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure bei 450 nm in einem sogenannten ELISA reader gemessen werden kann. Werden nun einige Kammern der ELISA-Platte mit Analysat einer vorbekannten Konzentration beschickt und so ein Standard mitgeführt, kann durch den Vergleich der Messwerte in den Proben-Kammern mit der Standard-Konzentrationskurve die Analysatkonzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden. Die in dieser Doktorarbeit verwendeten ELISA-Tests sind alle kommerziell erhältlich und wurden nach Maßgabe des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Eine Besonderheit stellen die Autoantikörper-ELISAs dar, da das *coating* der Platten hier nicht mit einem

capture antibody, sondern mit Doppelstrang-DNA bzw. mit dem Smith-Antigen erfolgte. Eine genaue Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte und der verwendeten Chemikalien findet sich, nach ELISA gestaffelt, in Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1 Details verwendeter ELISA-Verfahren

Target	murines Albumin	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12	IL-17A	IL-21	IL-23
Waschlösung	TrisNaCl pH 8.0 (6,1g Tris; 8,2g NaCl; H2O ad 1000 ml) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween
coating	100 µl 1:100 capture antibody in 0,05M Bicarbonat pH 9,6 (2,1g NaHCO3; 2,7g Na2CO3; H2O ad 500ml)	100 µl 1:250 capture antibody in PBS (vom Hersteller; keine näheren Angaben)	100 µl 1:250 capture antibody in 0,1M Natriumcarbonat pH 9,5 (7,1g NaHCO3; 1,6g Na2CO3; H2O ad 1000ml)	100 µl 1:250 capture antibody in 0,2M Natriumphosphat pH 6,5 (11,8g Na2HPO4; 16,1g NaH2PO4; H2O ad 1000ml)	100 µl 1:250 capture antibody in 0,2M Natriumphosphat pH 9,5 (7,1g NaHCO3; 1,6g Na2CO3; H2O ad 1000ml)	100 µl 1:250 capture antibody in 0,1M Natriumcarbonat pH 6,5 (11,8g Na2HPO4; 16,1g NaH2PO4; H2O ad 1000ml)	100 µl 1:250 capture antibody in 0,1M Natriumcarbonat pH 9,5 (7,1g NaHCO3; 1,6g Na2CO3; H2O ad 1000ml)	100 µl 1:250 capture antibody in PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween
Blocken	1% BSA in TrisNaCl	Blocklösung vom Hersteller (keine näheren Angaben)	10% FCS in PBS	10% FCS in PBS	10% FCS in PBS	10% FCS in PBS	10% FCS in PBS	Blocklösung vom Hersteller (keine näheren Angaben)
Verdünnung detection	1:35000	1:250 1:250	1:250 1:250	1:250 1:250	1:1000 1:250	1:200 1:1000	1:250 1:250	1:250 1:250
Target	TNF-alpha	CCL-2	CXCL-10	IFN-gamma	Gesamt-IgG	Anti-Smith IgG/IgM	anti-dsDNA IgG/IgM	
Waschlösung	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 7,0 (80g NaCl; 11,6g Na2HPO4; 2g KH2PO4; 2g KCl; H2O ad 10 l) + 0,05% Tween	PBS pH 8,0 (6,1g Tris; 8,2g NaCl; H2O ad 1000 ml)	TrisNaCl pH 8,0 (6,1g Tris; 8,2g NaCl; H2O ad 1000 ml)	TrisNaCl pH 8,0 (6,1g Tris; 8,2g NaCl; H2O ad 1000 ml)	TrisNaCl pH 8,0 (6,1g Tris; 8,2g NaCl; H2O ad 1000 ml)	
coating	100 µl 1:200 capture antibody in 0,1M Natriumcarbonat pH 9,5 (7,1g NaHCO3; 1,6g Na2CO3; H2O ad 1000ml)	100 µl capture antibody (2 µg/ml) in PBS pH 7,2	100 µl 1:250 capture antibody in 0,2M Natriumphosphat pH 6,5 (11,8g Na2HPO4; 16,1g NaH2PO4; H2O ad 1000ml)	100 µl 1:250 capture antibody in 0,1M Natriumphosphat pH 9,5 (7,1g NaHCO3; 1,6g Na2CO3; H2O ad 500ml)	100 µl 1:250 capture antibody in 0,05M Bicarbonat pH 9,6 (2,1g NaHCO3; 2,7g Na2CO3; H2O ad 500ml)	1% BSA in TrisNaCl	1% BSA in TrisNaCl	1% BSA in TrisNaCl
Blocken	10% FCS in PBS	10% FCS in PBS	1%BSA in PBS	10% FCS in PBS	1% BSA	1:50000	1:50000	1:50000
Verdünnung detection	1:200	1:250	1:180	1:250				

2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Zellpopulationsanalysen wurden mithilfe der Durchflusszytometrie erstellt. Bei dieser Methode wird eine Einzelzellsuspension (siehe oben) zunächst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen einzelne Zell(oberflächen)antigene gerichtet sind, gefärbt. Für die Messung wird die Zellsuspension in das Durchflusszytometer eingespeist (siehe auch

Abbildung 2-2), wo eine automatisierte Verdünnung mit PBS stattfindet, um sicherzustellen, dass im linearen Durchfluss der Messkammer immer nur eine Zelle mit ausreichendem Abstand zur nächsten Zelle analysiert wird. In der Messkammer wird jede Zelle von einem Laserstrahl getroffen, sodass das Laserlicht einerseits von der Zelle gebrochen bzw. gestreut wird, andererseits die Fluoreszenzfarbstoffe, die über die Antikörper an die Zelle gebunden sind, angeregt werden. Sowohl die Streuung (Vorwärtsstreuung, *forward scatter*, FSC; Seitwärtsstreuung, *side scatter*, SSC) als auch das jeweilige Fluoreszenzsignal werden von Detektoren aufgenommen, dann kombiniert (in Form eines *n*-tupels) pro Zelle („Event“) gespeichert und können dann analysiert werden. Die FSC-Werte geben in der Analyse Aufschluss über Zellgröße, die SSC-Werte über „Granularität“, was biologisch mit der Kernkonsistenz und –größe sowie dem Vesikelgehalt korreliert. Zusätzlich kann dann, je nach verwendeten Antikörpern, von den detektierten Fluoreszenzsignalen auf die Expression der jeweiligen Antigene rückgeschlossen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper/Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen sind im Materialteil aufgelistet, sämtliche Inkubationsschritte und Waschvorgänge erfolgten in Einklang mit den Herstellerangaben. Bei Oberflächenantigenen wurde der Antikörper direkt der Zellsuspension zugegeben, bei intrazellulären Antigenen wurde vor Inkubation eine Fixation und Zellpermeabilisierung durchgeführt. Wenn für eine Färbung sowohl Oberflächen- wie auch intrazelluläre Antikörper verwendet werden sollten, wurde zunächst die Inkubation mit dem Oberflächenantikörper abgeschlossen, dann fixiert und permeabilisiert und anschließend mit dem intrazellulären Antikörper inkubiert. Für die Inkubationen (60 Minuten bei 4°C) wurde grundsätzlich eine Antikörperzielkonzentration von 3-5µg/ml angestrebt, um einen Antikörperüberschuss sicherzustellen. Die Zellfixierung und –permeabilisierung erfolgte mit den im FoxP3-Set enthaltenen Chemikalien, deren genaue Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben wird. Jedem Inkubationsschritt folgten

zwei Abwaschschritte, um nicht gebundenen Antikörper zu eliminieren. Zunächst wurden 2 ml 4°C kalten PBS dem Inkubationsansatz zugegeben, dann der Ansatz bei 2000 rcf für

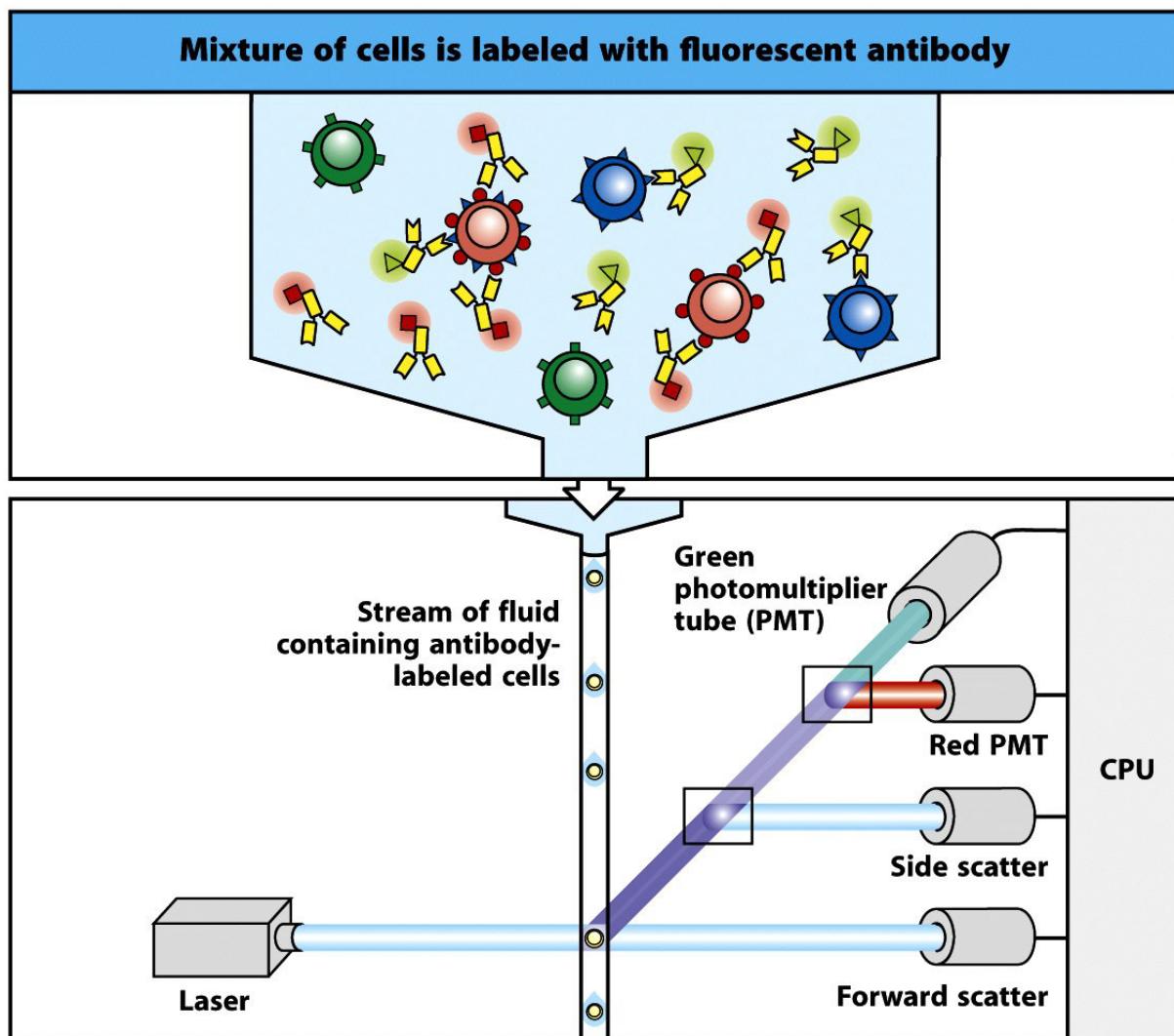


Abbildung 2-2 Durchflusszytometrie [aus (Murphy et al., 2008)]

CPU=central processing unit

5 Minuten abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet nach dem ersten Waschschritt erneut in 2 ml PBS resuspendiert, nach dem zweiten Waschen für die durchflusszytometrische Messung in 400 µl.

Die zur Charakterisierung verschiedener Zelltypen herangezogenen Antikörperfektionskombinationen waren: CD3+CD4+ für T-Helferzellen, CD3+CD4+CD25+FoxP3+ für regulatorische T-Zellen, CD3+CD4+ IFN γ + für Th1-Zellen, CD3+CD4+IL17+ für Th17-Zellen, CD3+CD8+ für zytotoxische T-Zellen, CD3+CD4-CD8- für autoreaktive T-Zellen, NK1.1+IL17+

für Natürliche Killerzellen, B220+IgM+IgD+ für reife B-Zellen, B220+CD21++CD23+ für B-Zellen der Marginalzone, B220+CD21+CD23++ für Lymphfollikel-assoziierte B-Zellen, CD19+CD5+CD43+ für splenische B1-Zellen, CD19+CD5+ für peritoneale B1-Zellen, CD138+κ-Leichtkette+ für Plasmazellen, F4/80+CD11b+MHCII+ für M1-Makrophagen, F4/80+CD11b+CD206+ für M2-Makrophagen sowie CD11c+CD4+ und CD11c+CD8+ und CD11c+CD4-CD8- für die verschiedenen Subtypen von DCs und CD11c+F4/80+MHCII+ sowie CD11c+CD40+ für ausgereifte, aktivierte DCs.

2.2.5 Histologische Untersuchungen

2.2.5.1 Färbungen

Vor der Paraffin-Einbettung wurden Lungen, Milzen und Nieren der Tiere nach Entnahme wie oben beschrieben über Nacht in 4% Formalin fixiert. Nach Paraffinierung wurden Schnitte der Dicke 2 µm auf Ammoniumpersulfat-beschichteten Objektträgern 12 h bei 37° C getrocknet. Dann wurden die Schnitte in Xylol und in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und gespült. Für die Perjodsäure-Schiff- (*periodic acid-Schiff* ; PAS) Färbung wurden die Schnitte 10 min mit Perjodsäure inkubiert, mit destilliertem Wasser gespült und dann 20 min mit fuchsinschwefliger Säure (Schiff'sches Reagenz) inkubiert. Überschüssige Säure wurde anschließend durch Kaliummethabisulfit-Spülung entfernt und es erfolgte eine 3 minütige Hämalaun-Gegenfärbung. Nach 10 minütigem Bläuen des Hämalaun unter fließendem Wasser erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, ein kurzes Xylolbad und die Eideckelung des Präparates.

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Schnitte nach Entparaffinierung zur endogenen Peroxidase-Blockierung 20 min in 1:1 Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung eingelegt. Nach Abwaschen dieser Lösung mit PBS wurden die Schnitte in Vectashield™ Antigen-Demaskierungslösung 10 Minuten gekocht und nach Abkühlen sequentiell je 15 Minuten mit Avitin und Biotin geblockt. Anschließend erfolgte die Primärantikörper-Inkubation (zwischen 1 Stunde und übernacht, je nach Antikörper) und eine 30 minütige Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper. Nach ebenfalls 30 minütiger Entwicklung im ABC-Reagenz wurden die Schnitte mit Methylgrün gegengefärbt und wie oben angegeben entwässert und eingedeckelt. Zur antinukleären Antikörper-Bestimmung wurden mit HEp-2 – Zellen beschichtete Objektträger mit dem Serum der Versuchstiere in

unterschiedlichen Verdünnungen 30 Minuten inkubiert, mit fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-IgG-Antikörpern 30 Minuten im Dunkeln gegengefärbt und abschließend in mit DAPI versetztem Fixiermedium eingedeckelt.

2.2.5.2 Bewertung

Der Nierenschaden im Rahmen der Lupusnephritis kann auch in Mäusen mit Hilfe der Aktivitäts- und Chronizitätsscores für die humane Lupusnephritis bewertet werden (Austin et al., 1984)

Dabei werden unter mindestens 100x Vergrößerung das glomeruläre, das tubuläre und auch das interstitielle Kompartiment der Niere untersucht und wie folgt bewertet: Beim Aktivitätsindex wird das Vorhandensein von glomerulären Zellproliferaten, Leukozyteninfiltraten, hyalinen Ablagerungen und interstitieller Entzündung jeweils einfach und das Vorhandensein von parietalen Zellproliferaten an der Bowman-Kapsel (sog. Halbmondbildung) und glomerulären Nekrosen jeweils doppelt je nach Ausprägung von 0 (nicht vorhanden) bis 3 (ausgeprägt vorhanden) verrechnet (maximaler Wert damit $4 \times 3 + 2 \times 6 = 24$); beim Chronizitätsindex werden Vorhandensein einer glomerulären Sklerose, fibröser Halbmonde, tubulärer Atrophie und interstitieller Fibrose je nach Ausprägung wieder von 0-3 bewertet und verrechnet (maximaler Wert hier $4 \times 3 = 12$). Die Lungenbeteiligung wurde untersucht, indem semiquantitativ das Ausmaß peribronchialer, perivaskulärer und interstitieller Leukozyteninfiltrate von 0 (keine Pathologie) bis 4 (massive Infiltrate) bewertet wurde (Sunderrajan et al., 1986). In den Mac2-gefärbten Schnitten wurden die über 10 Gesichtfelder gemittelten Zellzahlen intraglomerulärer, Mac2+ Zellen erfasst.

2.2.6 mRNA-Expressionsanalysen

Um die Expression von mRNAs verschiedener im Rahmen der Entzündungsreaktion im Allgemein und des SLE im Speziellen interessanter Proteinmarker zu bestimmen, wurde neben dem ELISA-Verfahren ein weiteres hochsensitives Verfahren angewendet. Dieses Verfahren, das letztendlich auf der PCR (siehe oben) beruht hat dabei 3 Stufen:

2.2.6.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation mit dem *RNA Mini Kit* wurden gemäß den Herstellerangaben in RNA-later eingelegte Gewebestücke in ca. 0,5 ml Lyse-Puffer mit 1% β-Mercapto-Ethanol in einem Eppendorfgefäß mittels Mikropistill homogenisiert und gevortext. Das visköse Zelllysat wurde 1:1 mit 70% Ethanol vermischt und 700 µl dieses Gemischs auf ein Silica-Säulchen in einem kleinen Plastikbehälter pipettiert. Nach einer 15-sekündigen Zentrifugation bei 12.000 rcf wurde der Durchfluss durch das Säulchen aus dem Plastikbehälter verworfen, der Rest des Lysat-Ethanol-Gemischs auf das Säulchen pipettiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die im Silica-Säulchen gebundene RNA wurde nun mit zwei verschiedenen Wasch-Puffern gewaschen, wobei 700 µl Waschpuffer 1, gefolgt von 2x 500 µl Waschpuffer 2, jeweils getrennt durch eine 15-sekündige Zentrifugation bei 12.000 rcf auf das Säulchen aufgetragen wurden. Nach Abschluss der Waschschrifte wurde das Silica-Säulchen 2min unter Zentrifugation bei 12.000 rcf getrocknet, in ein RNase-freies Eppendorfgefäß überführt und es wurden 50 µl RNase.freies H₂O aufpipettiert. Um mit dem Wasser die gewaschene RNA auszuspülen, wurde nach einer Wartezeit von 1 min nun ein letztes Mal mit 15.000 rcf zwei Minuten zentrifugiert. Die Qualität der Isolation sowie die RNA-Konzentration des Eluats aus der letzten Zentrifugation wurden anhand der optischen Dichtemessung bei 260nm und 280 nm bestimmt, wobei nur Material aus Isolationen mit einem OD-Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 für die weiteren Experimente verwendet wurde.

2.2.6.2 Reverse Transkription

Die erhaltene RNA muss vor der Durchführung der PCR in sogenannte *complementary* (c-)DNA umgeschrieben werden, wofür eine reverse Transkriptase (RT) verwendet wird. Dazu wurden 2 µg RNA in 10 µl RNase-freiem H₂O nach fünfminütiger Schüttelinkubation bei 65° C auf Eis mit 8µl 5x-Puffer, 0,8µl 25mM dNTPs, 2µl 0,1M DTT, 0,5µl linearem Acrylamid (15µl/ml), 0,43µl Hexanucleotiden, 1µl RNAsin (40U/µl) und 0,87 µl SuperScript II RT in 16,4µl RNase-freiem H₂O für 90 Minuten bei 42° C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wird die RT 5 Minuten bei 85° C denaturiert und die Reaktion so abgeschlossen. Neben dem Umschreiben der RNA jeder Probe in cDNA für die PCR wurde RNA aus jeder Probe zusätzlich ebenfalls anstatt mit RT auch mit H₂O inkubiert. Die so generierten RT- Ansätze

wurden ebenso wie die eigentlichen Proben, die RT+ Ansätze in der PCR mitgeführt, um die Spezifität des in der PCR gemessenen Signals für die cDNA zu beweisen.

2.2.6.3 quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA durch die RT kann ein DNA-basiertes Verfahren wie die PCR zum Einsatz kommen. Da die oben angegeben Reaktionsschritte der PCR durch ebenfalls iterative Messungen der Menge an amplifizierter DNA ergänzt werden (und die Probenaufbereitung die RT-abhängige cDNA-Synthese beinhaltet), spricht man in diesem Zusammenhang auch von RT- quantitativer (q-)PCR oder synonym von real-time (rt-)PCR. Die nach jedem PCR-Zyklus erfolgende DNA-Quantifizierung basiert dabei auf der Fluoreszenzmessung eines Markers (z.B. SYBR green I), der zwei Bedingungen erfüllen muss: 1. Interkalierung in dsDNA und 2. mit der Interkalierung verbundene Steigerung bzw. Veränderung des Fluoreszenzsignals. Unter diesen Voraussetzungen ist das gemessene Fluoreszenzsignal nach jeden Zyklus direkt proportional zur Menge an vervielfältigter DNA. Wie in 2.1.1.3 ausgeführt, besteht ein RT-qPCR-Zyklus also zunächst ebenfalls aus Linearisierung der DNA und anschließender Komplementärstrang-Synthese durch die Taq-Polymerase, wobei dann eine automatisierte Fluoreszenzmessung eingeschoben ist, bevor die ersten beiden Schritte wiederholt werden. Da in den ersten Zyklen der PCR noch wenig Matrizenstränge für die Amplifikation vorliegen, ist der Anstieg des Fluoreszenzsignals in diesem Bereich nicht verwertbar. Erst wenn genug Matrizenstränge vorhanden sind, steigt das Fluoreszenzsignal exponentiell an. Für die Auswertung wird nun die Zykluszahl bestimmt, bei der das bereits exponentiell wachsende Fluoreszenzsignal erstmals deutlich die Hintergrundfluoreszenz übersteigt (cycle threshold, Ct). Um eine potentielle Unspezifität der verwendeten Amplifikationsprimer auszuschließen kann außerdem am Ende eine weitere Fluoreszenzmessung erfolgen, während die Proben immer weiter erhitzt werden. Dabei kommt es abhängig von Basenzusammensetzung und Fragmentlänge bei einer gegebenen Temperatur zum Aufschmelzen der dsDNA und damit zu einem rapiden Abfall der SYBR green I Fluoreszenz. Wenn es über den ganzen Temperaturbereich nun also nur einen Punkt gibt, an dem die Fluoreszenz abfällt, dann gibt es auch nur ein amplifiziertes Fragment, sodass von einer Spezifität der verwendeten Primer ausgegangen werden kann. Die Quantifizierung der initialen cDNA-Menge (die ja die ursprüngliche Menge mRNA widerspiegelt) wird erreicht, in dem der Ct-Wert für diese cDNA ins Verhältnis zum Ct-Wert

eines sogenannten *housekeepers* in der selben Probe gesetzt wird. *Housekeeper* sind konstitutiv und nicht-differentiell exprimierte RNAs, die so Schwankungen der generellen RNA-Konzentration zwischen verschiedenen Proben ausgleichen und so den Vergleich verschiedener Proben ermöglichen. In dieser Arbeit wurde 18s ribosomale RNA als *housekeeper* verwendet, in allen qPCR-Abbildungen finden sich die mRNA-Konzentrationen daher ins Verhältnis zu 18s rRNA gesetzt. Die qPCR wurde mit dem Roche LightCycler® 480 durchgeführt. Hierzu wurden sowohl RT+ als auch RT- Proben (siehe oben) zunächst mit DEPC-H₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt, um Ribonukleasen zu inaktivieren. Dann wurden 2 µl der so verdünnten Proben mit 10 µl qPCR-Mastermix (2ml 10x-Taq-Puffer; 150µl 25 mM dNTPs; 4ml PCR-Optimizer; 200µl BSA (20 mg/ml); 40µl SYBRgreen I; 2,4ml 25mM MgCl₂; H₂O ad 10ml) sowie jeweils 0,6 µl des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, 6,64 µl DEPC-H₂O und 0,16 µl Taq-Polymerase in Dupletten in die Kammern einer speziellen 96-Kammer-PCR-Platte pipettiert und mit einer Folie luftdicht verschlossen. Um sicherzustellen, dass der gesamte Reaktionsansatz von 20 µl am Boden der Kammern anlag, wurden die Platten bei 4° C zwei Minuten mit 280 rcf abzentrifugiert. Die PCR-Reaktionsschritte waren wie folgt: Präinkubation bei 95° C für 5 Minuten, dann iterativ 15 Sekunden 95° C, gefolgt von 45 Sekunden 65° C, bei 40 Wiederholungen. Zum Abschluss erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, indem erneut eine fünfminütige Inkubation bei 95° C gefolgt von einer konstanten Temperaturerhöhung von 65° C auf 95° C durchgeführt wurde. Ct-Werte wurden verwendet, wenn sie den 35. Zyklus nicht überschritten und ausserdem die RT- Proben kein Signal zeigten. Alle Schritte wurden nach den MIQE-Richtlinien für qPCR durchgeführt (Bustin et al., 2009).

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde anhand des zweiseitigen *student's t-test* für unverbundene Stichproben überprüft. Signifikanz wurde ab p<0,05 angenommen, p<0,01 galt als hochsignifikant. In den Graphiken dargestellt sind Mittelwerte ± *standard error of the mean* (SEM), ab einem Signifikanzniveau von p<0,5 sind die Graphiken mit einem „*“ gekennzeichnet, analog dazu bei p<0,01 mit „**“ und bei p<0,001 mit „***“. Bei Tierversuchen beziehen sich die Mittelwerte je nach Versuch auf Gruppen von 8-12 Tieren, bei Zellkulturversuchen auf die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3 Ergebnisse

3.1 IRF4 reguliert die Entzündungsaktivität in B6^{Ipr} Mäusen

Zur Bestimmung der systemischen Entzündungsaktivität der B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäuse wurden zunächst die Konzentrationen verschiedener Entzündungsmediatoren im Plasma der Tiere bestimmt und mit denen von B6^{Ipr/Irf4+/+} Mäusen verglichen. Es zeigte sich, dass sowohl die Konzentrationen von IL-12p40 als auch von TNF-α in den *Irf4*-defizienten Tieren hochsignifikant bzw. signifikant erhöht waren. Insbesondere war bei TNF-α auffällig, dass es im Plasma *Irf4*-kompetenter B6^{Ipr} Mäuse überhaupt nicht nachweisbar war. Im Gegensatz dazu waren die Plasmaspiegel von IL-17 und IL-21 bei B6^{Ipr/Irf4+/+} Mäusen hochsignifikant höher (IL-17) bzw. bei *Irf4*-defizienten Tieren nicht nachweisbar (IL-21). Unabhängig vom *Irf4*-Genotyp waren IL-4 und IL-6 im Plasma der Tiere nachweisbar, wobei es einen Trend zu höheren Spiegeln in *Irf4*-defizienten Tieren gab. CCL-2, IL-23 und IFN-γ konnten weder bei B6^{Ipr/Irf4-/-} noch bei B6^{Ipr/Irf4+/+} Tieren im Plasma detektiert werden. Bei einzelnen *Irf4*-defizienten Tieren waren außerdem IL-10- Spiegel detektierbar, bei der Mehrzahl der B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäuse sowie bei allen B6^{Ipr/Irf4+/+} Mäusen war IL-10 allerdings im Plasma nicht nachweisbar. Es zeigte sich also, dass die systemische Entzündung, ein Surrogatparameter der SLE-Aktivität bei IRF4-Defizienz erhöht war.

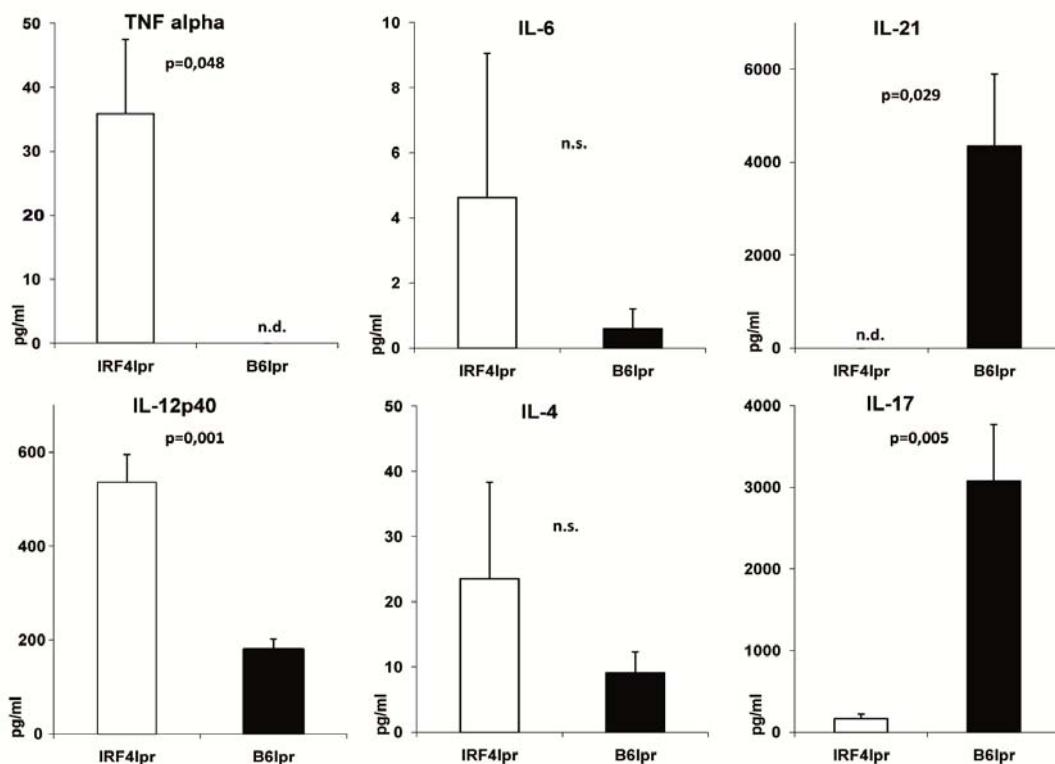
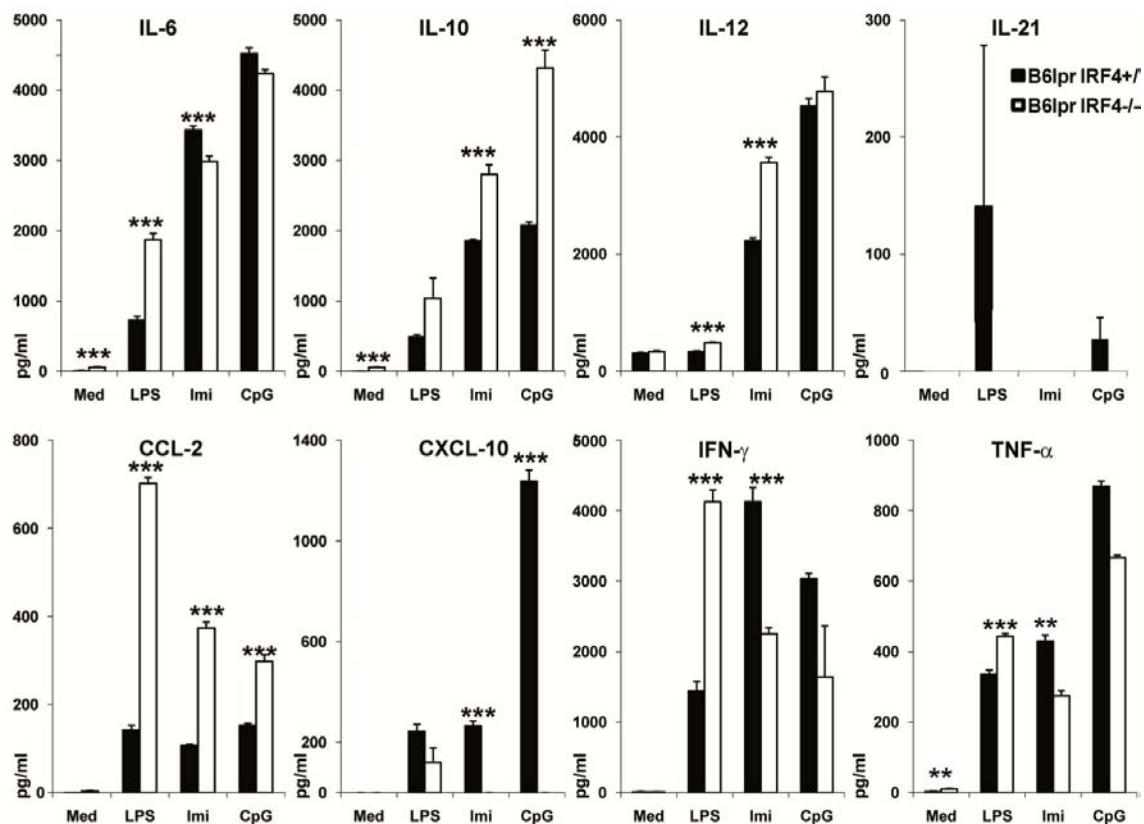


Abbildung 3-1 Systemische Entzündung in B6^{lpr/lrf4-/-} Mäusen

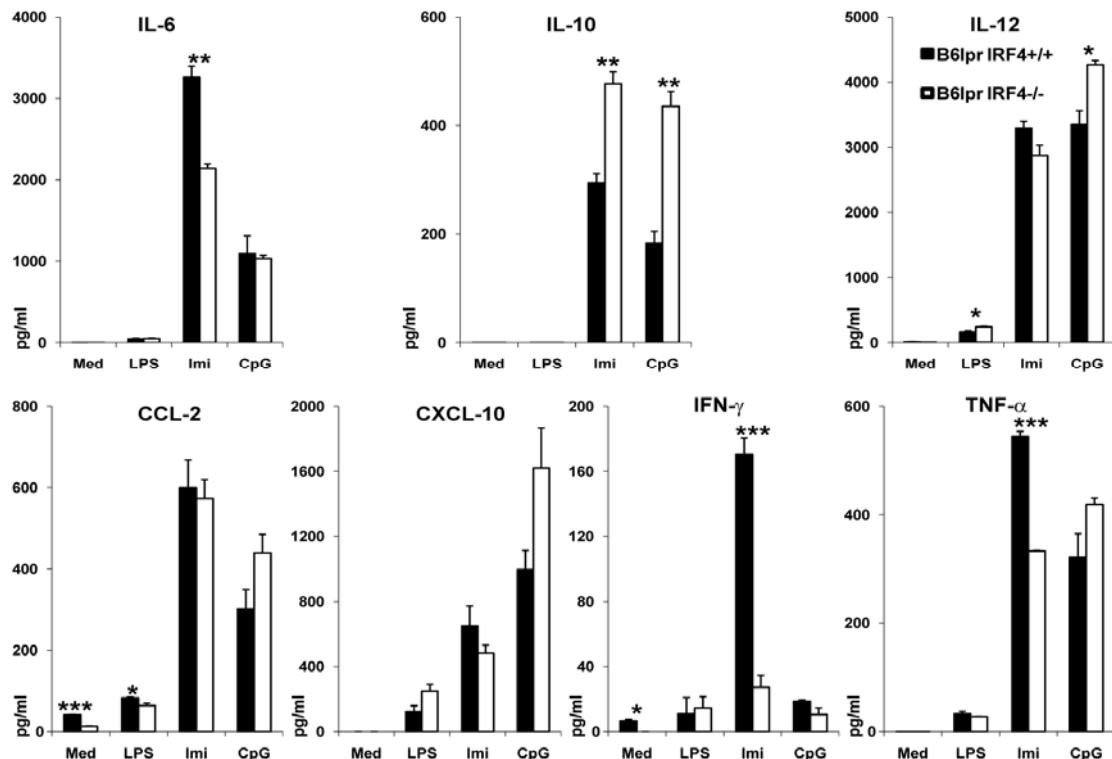
ELISA-Messungen der jeweiligen Zytokine im Plasma; Konzentrationen in pg/ml; p Werte nummerisch angegeben; n.s. =nicht signifikant; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

3.2 IRF4 hat unterschiedliche Wirkungen in TLR-Signalwegen

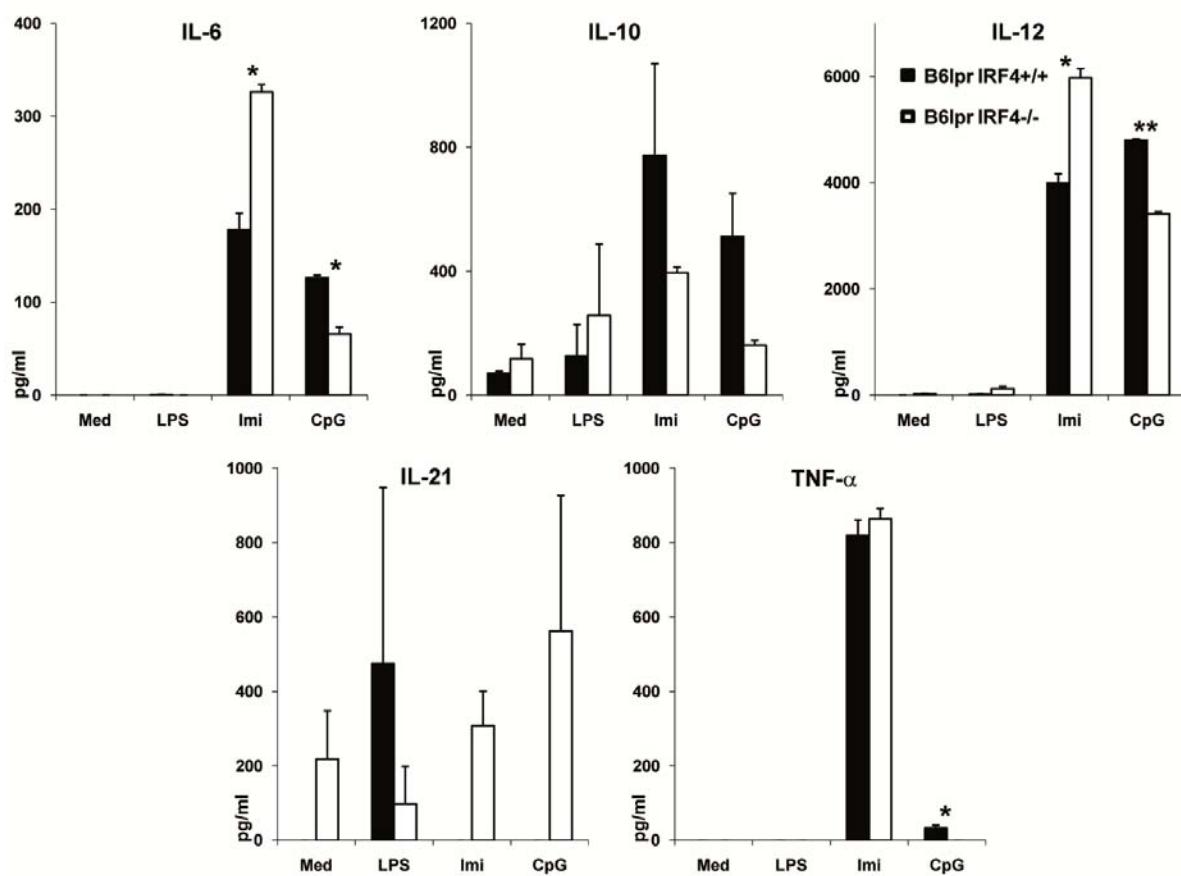
Um weiteren Einblick in die Regulation der systemischen Entzündungsaktivität, die involvierten Zelltypen und die jeweilige Rolle von IRF4 in den verschiedenen Zelltypen zu erlangen, wurden aus dem Blut der Mäuse isolierte mononukleäre Immunzellen (PBMCs), aus Knochenmark generierte DCs (BMDCs) sowie direkt nach Entnahme der Milzen isolierte Splenozyten kultiviert, in Zellkultur für 24 h mit den TLR-Agonisten LPS (TLR4), Imiquimod (TLR7) und CpG-Oligonukleotiden (TLR9) bzw. mit Mediumkontrolle stimuliert anschließend mittels ELISA die Konzentrationen verschiedener pro-entzündlicher Chemo- und Zytokine im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Untersuchungen sind in Abbildung 3-2 bis Abbildung 3-4 dargestellt. Im Fall der PBMCs wurden nach Stimulation auch IL-17, CCL-2 und IFN- γ gemessen, diese Marker waren aber nicht nachweisbar, ebenso konnte IL-17 in den Splenozytenkulturüberständen nicht nachgewiesen werden. In den Experimenten zeigte sich, dass in Splenozyten bei Abwesenheit von IRF4 die Produktion verschiedener pro-entzündlicher Mediatoren nach TLR-Stimulation, insbesondere TLR4-Aktivierung mit LPS gesteigert war. Interessanterweise war aber zur optimalen Aktivierung des TLR7- Signalweges IRF4 notwendig, sodass in B6^{*lpr/lrf4-/-*} Splenozyten die Produktion von IL-6, CXCL-10, IFN- γ und TNF- α nach Imiquimod-Stimulation hochsignifikant geringer war als in B6^{*lpr/lrf4+/+*} Splenozyten. Diese Beobachtungen bei den Splenozyten ließen sich nur teilweise auf BMDCs und PBMCs übertragen, die im Allgemeinen deutlich weniger auf LPS-Stimulation ansprachen. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass IRF4 in den verschiedenen Zelltypen und Signalwegen offenbar unterschiedliche Wirkungen hat.

**Abbildung 3-2 Splenozyten-Stimulationsexperimente**

ELISA-Messungen der jeweiligen Zytokine nach 24 h; Konzentrationen in pg/ml; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

**Abbildung 3-3 BMDC-Stimulationsexperimente**

ELISA-Messungen der jeweiligen Zytokine nach 24 h; Konzentrationen in pg/ml; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

**Abbildung 3-4 PBMC-Stimulationsexperimente**

ELISA-Messungen der jeweiligen Zytokine nach 24 h; Konzentrationen in pg/ml; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001;
Werte sind Mittelwerte +/- SEM

3.3 IRF4 reguliert Ausreifung und Aktivierung von Milz-APCs

Da das starke Ansprechen der Splenozyten auf TLR4-Stimulation bei gleichzeitig geringem Ansprechen von PBMCs wahrscheinlich von CD11b+ oder CD11c+ APCs der Milz ausgeht, BMDCs aber ebenfalls wenig auf LPS reagierten, wurde als nächstes die Hypothese geprüft, ob splenische APCs bei $B6^{lpr/lrf4-/-}$ Mäusen in unterschiedlichen Mengen, Differenzierungen oder Aktivierungszuständen vorkommen. Hierzu wurden direkt nach Milzentnahme isolierte Splenozyten durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abbildung 3-5). Es zeigten sich abhängig vom IRF4-Genotyp deutliche Unterschiede: In $B6^{lpr/lrf4-/-}$ Tieren war die Gesamtzahl CD11c+ dendritischer Zellen signifikant erhöht, wobei dies überwiegend auf CD4+ und CD4-CD8- (DN) DCs zurückzuführen war. In Abwesenheit von IRF4 kam es auch zu einer Zunahme der für die Aktivierungsmarker CD40, F4/80 und MHCII positiven CD11c+ DCs. Dasselbe Bild zeigte sich bei aktivierte Makrophagen (CD11b+F4/80+), wobei hier sowohl klassisch (M1, MHCII+) als auch alternativ (M2, MR/CD206+) aktivierte Makrophagen in *lrf4*-defizienten Tieren mit erhöhter Frequenz gefunden wurden. Die Polarisation der Makrophagen (M1- vs. M2- Phänotyp) wurde zusätzlich anhand der mRNA-Expression verschiedener Marker in der Milz genauer betrachtet (siehe Abbildung 3-6). Hier zeigten sich nur bei den M2-Markern Ym1 und Fizz1 sowie bei TGF- β signifikante Unterschiede zwischen $B6^{lpr/lrf4-/-}$ und $B6^{lpr/lrf4+/+}$ Mäusen. Da IRF4 außer von Makrophagen insbesondere von DCs exprimiert wird, wurden mittels MACS CD11c+ Zellen aus Splenozyten gewonnen und auf die mRNA Expression verschiedener pro-entzündlicher Marker untersucht. Abbildung 3-7 zeigt, dass sich die CD11c+ in der Expression von TLR7 nicht signifikant unterscheiden, jedoch in Abwesenheit von IRF4 signifikant weniger IL-6 und TNF- α produzieren. Dies steht in Einklang mit den Zellstimulationsexperimenten. Zusätzlich wurde die Expression zweier Typ 1-IFN induzierter Gene (MX1 und IFIT1) sowie IFN- β selbst überprüft, hier wurden aber keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden.

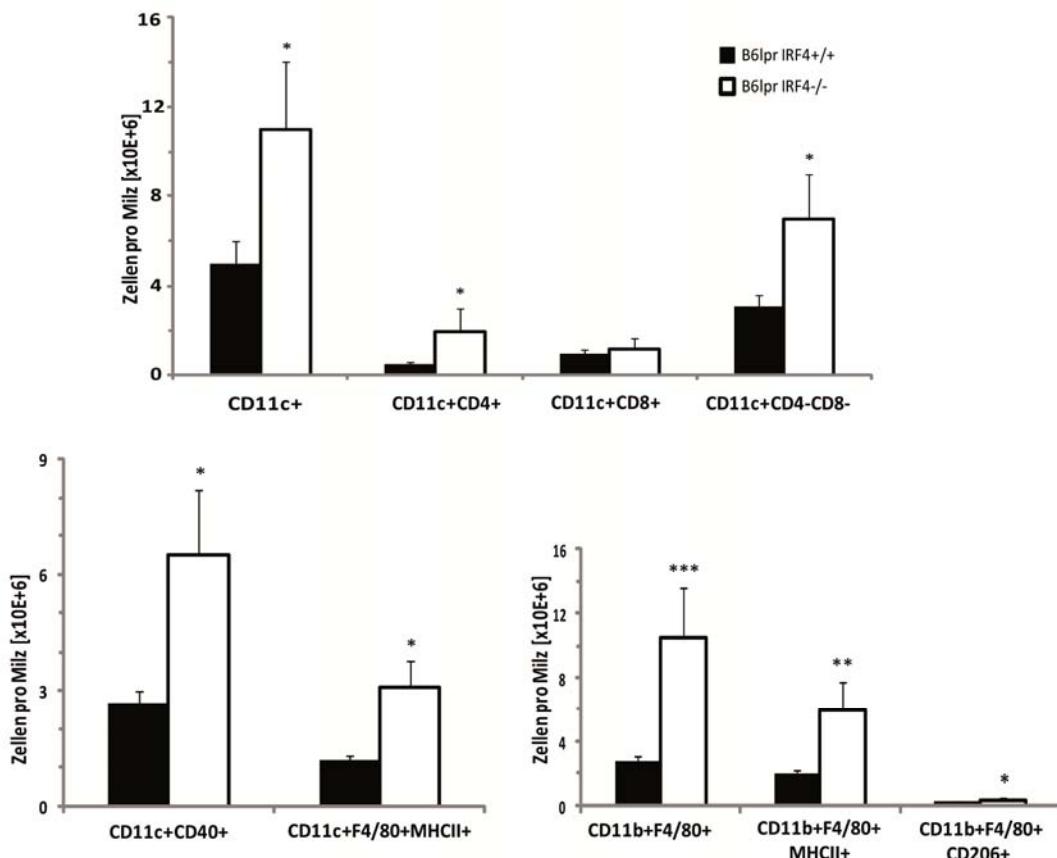


Abbildung 3-5 Durchflusszytometrische Analyse splenischer APC-Populationen

CD11c-positive dendritische Zellen (oben) und CD11b-positive Makrophagen (unten); *p<0.05; **p<0.01;

***p<0,001; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

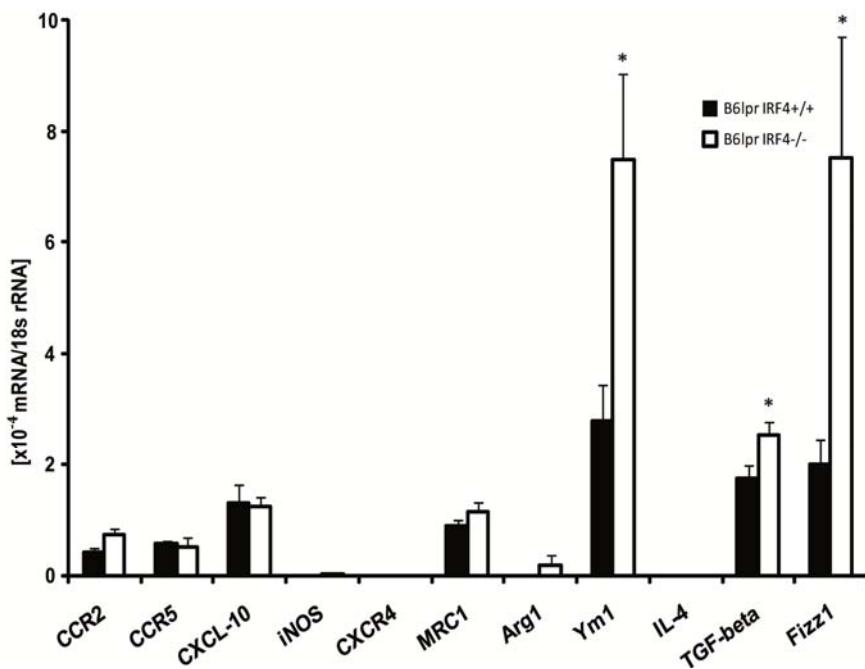


Abbildung 3-6 Expression M1- vs. M2-assozierter mRNA Marker in der Milz

real-time PCR-Analysen von Milzhomogenisaten; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

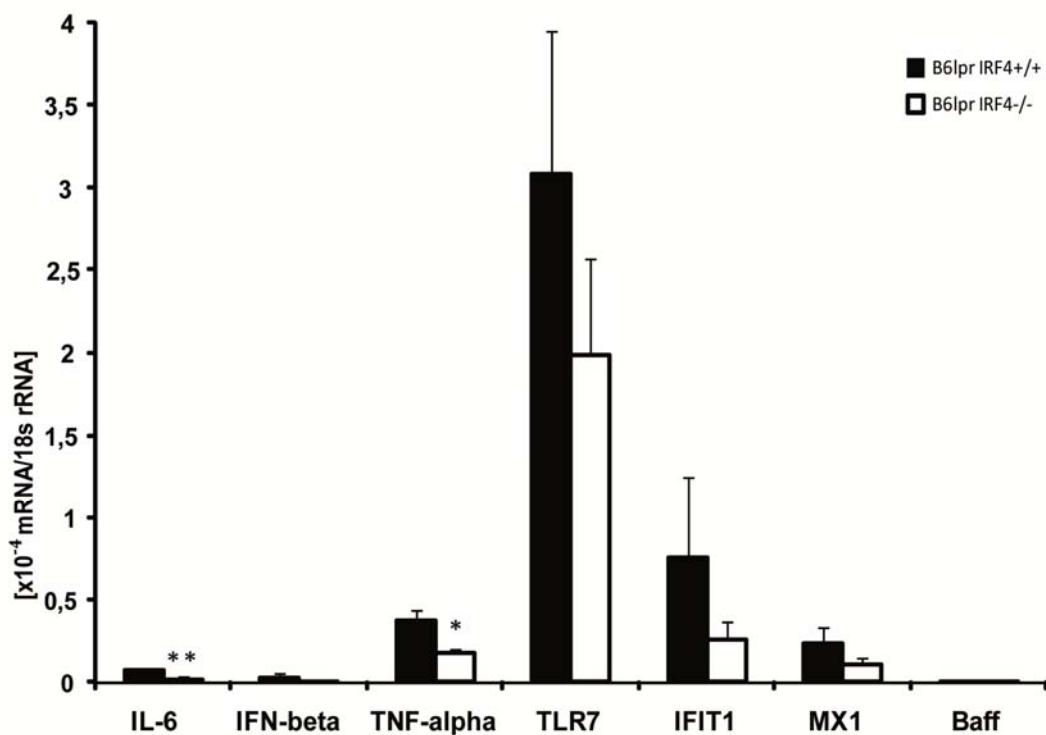


Abbildung 3-7 mRNA Expression in CD11c+ Splenozyten

real-time PCR-Analysen nach CD11c+Zellisolation aus der Milz; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001;
Werte sind Mittelwerte +/- SEM

3.4 IRF4-Defizienz verhindert im B6^{Ipr} Tiermodell Endorganschaden

3.4.1 B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäuse entwickeln keine Lupusnephritis

Nach Vorarbeiten zur sterilen Entzündung in *Irf4*-defizienten Tieren und dem Nachweis der erhöhten Entzündungsaktivität in B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäusen hypothetisierten wir, dass es durch IRF4-Defizienz zu einer Aggravation des SLE-Phänotyps der B6^{Ipr} Mäuse, kommen würde. Da die IRF4-Defizienz mit einer Hyperreagibilität renaler APCs einhergeht, sollte es, so die Hypothese, insbesondere zur Aggravation der Lupusnephritis kommen. Hierzu wurden zunächst einige auch klinisch zur Anwendung kommende Parameter untersucht, nämlich die Kreatinin- und Harnstoff-Konzentrationen im Plasma sowie der Albumin-Kreatinin-Quotient im Urin. Wie in Abbildung 3-8 dargestellt, fand sich hier überraschenderweise allerdings der nicht-signifikante Trend zu niedrigerem Kreatinin und Harnstoff bei *Irf4*-defizienten Tieren, während eine Albuminurie im Alter von 6 Monaten unabhängig vom *Irf4*-Genotyp nicht nachgewiesen werden konnte.

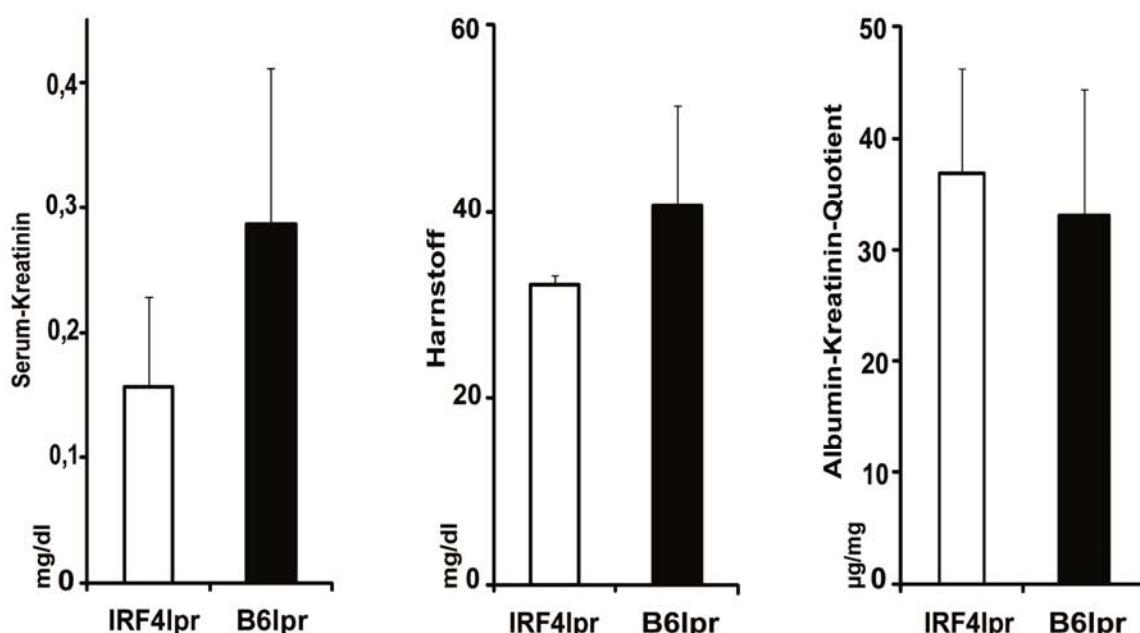


Abbildung 3-8 Renale Funktionsparameter

Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma und Albumin-Kreatinin-Quotient im Urin im Alter von 6 Monaten; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

IRF4-Defizienz führt also nicht zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion im B6^{lpr} Modell. Um eine genauere Bestimmung der Entzündungsaktivität in der Niere vorzunehmen, wurden im nächsten Schritt die Nieren der Tiere histologisch aufbereitet. Hierzu wurden Nierenschnitte sowohl mit PAS-Lösung als auch immunhistochemisch mit Antikörpern gegen IgM, IgG und Komplementfaktor C9 angefärbt. Die PAS-Schnitte wurden gemäß den Lupusnephritis-Indizes für Aktivität und Chronizität bewertet, die immunhistologischen Präparate wurden qualitativ untersucht. Abbildung 3-10 zeigt für B6^{lpr/lrf4+/+} und B6^{lpr/lrf4-/-} Tiere ein jeweils repräsentatives histologisches Bild. Während sich bei *Irf4*-kompetenten B6^{lpr} Mäusen wie erwartet mit diffuser Mesangialmatrixvermehrung, mesangialen Zellproliferaten und gelegentlichen Glomerulusadhäsionen histologische Merkmale einer diffus-proliferativen (lupusartigen) Glomerulonephritis fanden, fehlte bei *Irf4*-defizienten Mäusen bis auf eine nur bei einzelnen Tieren vorkommende, leichte Mesangialzellvermehrung jedwede Nierenpathologie. Dieser Kontrast verschärfte sich in der Immunhistologie umso mehr, als hier die bei B6^{lpr/lrf4+/+} konsistent nachweisbaren kapillären IgM- und IgG- Ablagerungen sowie die mesangialen IgG- und C9- Ablagerungen in den Nieren von B6^{lpr/lrf4-/-} Mäusen komplett fehlten. Die jeweiligen Aktivität- und Chronizitätscores für die Lupusnephritis-Graduierung sind in Abbildung 3-9 dargestellt.

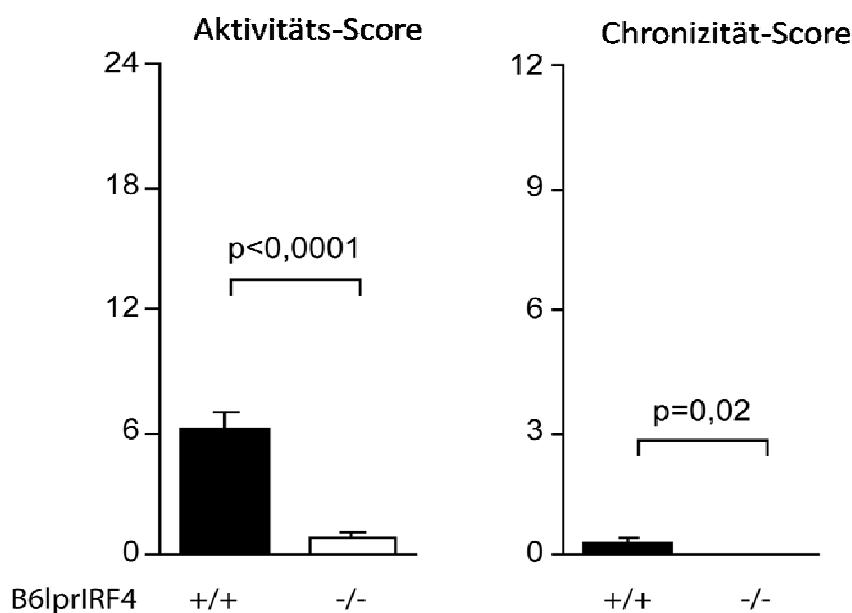
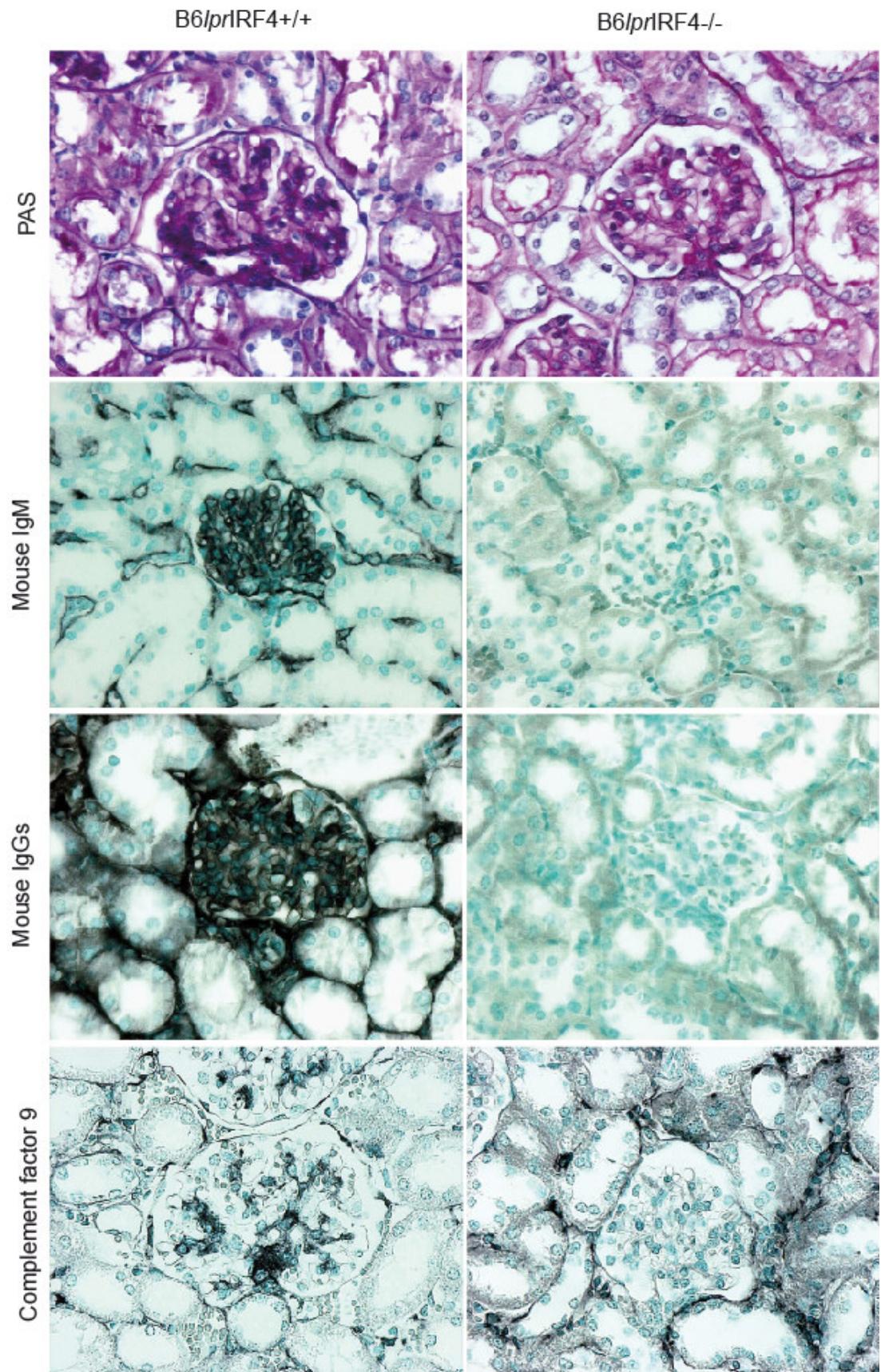


Abbildung 3-9 Lupusnephritis Aktivität- und Chronizitätscores

Zur Berechnung der semiquantitativen Aktivität- und Chronizitätsscores wurden PAS-gefärbten Nierenschnitte bewertet; siehe auch Abschnitt 2.2.5.2; Werte sind Mittelwerte +/- SEM.

**Abbildung 3-10 Nierenhistologie**

Repräsentative Nierenhistologien nach *Irf4*-Genotyp; PAS-, IgM-, IgG- und Komplementfaktor 9 Färbungen (von oben nach unten); Vergrößerung 400x

Um neben den histopathologischen Beobachtungen zusätzliche Informationen über die intrarenale Entzündungsaktivität zu gewinnen, wurden die Konzentrationen verschiedener pro-entzündlicher mRNAs im Nierengewebe bestimmt. In Abbildung 3-11 und 3-12 ist die intrarenale mRNA-Expression von Makrophagenpolarisationsmarkern, pro-entzündlichen Zytokinen und Chemokinen dargestellt. Auch hier zeigte sich, dass es kaum Entzündungsaktivität innerhalb der Nieren von *Irf4*-defizienten Tieren gab.

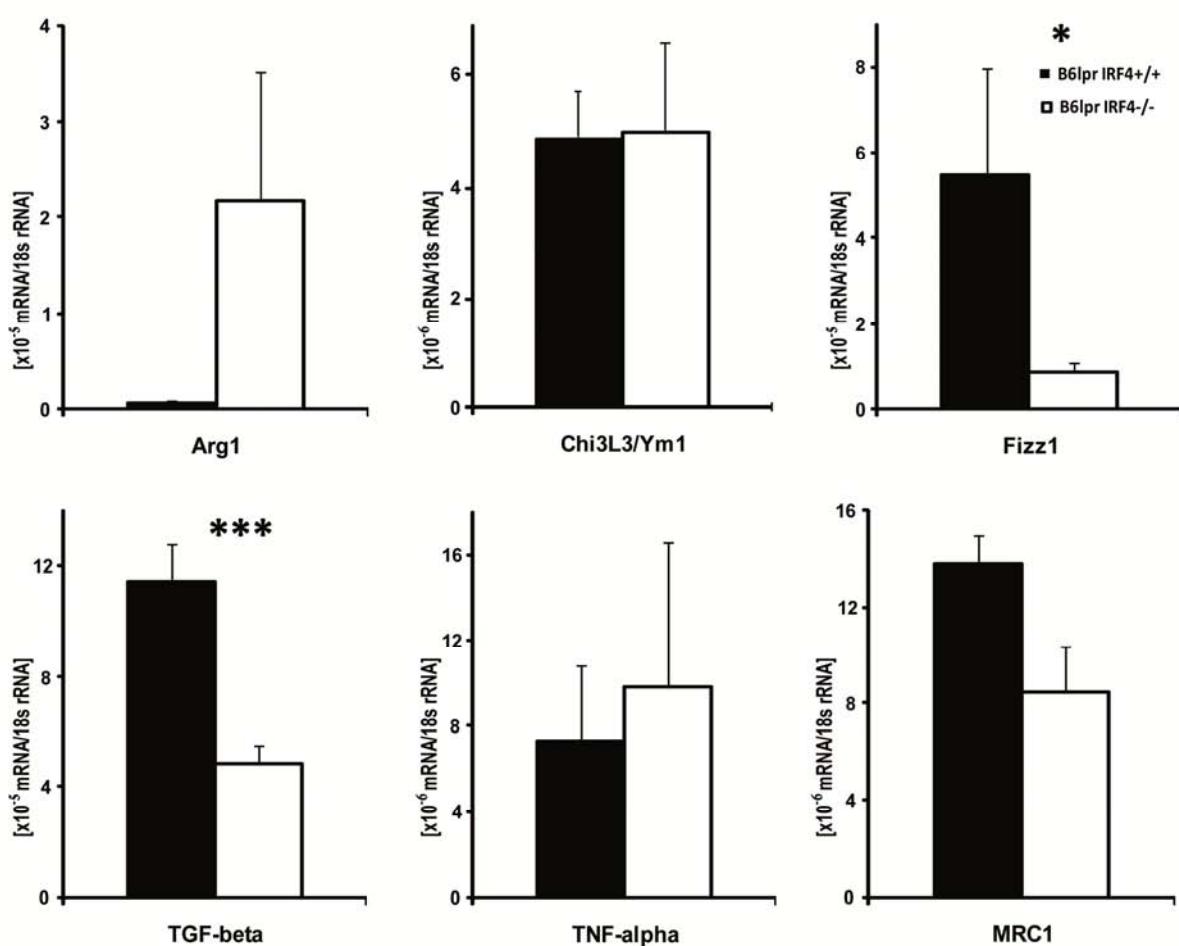


Abbildung 3-11 intrarenales mRNA-Expressionsprofil verschiedener Mφ-Polarisationsmarker
real-time PCR-Analysen aus Nierenhomogenisaten; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001;
Werte sind Mittelwerte +/- SEM

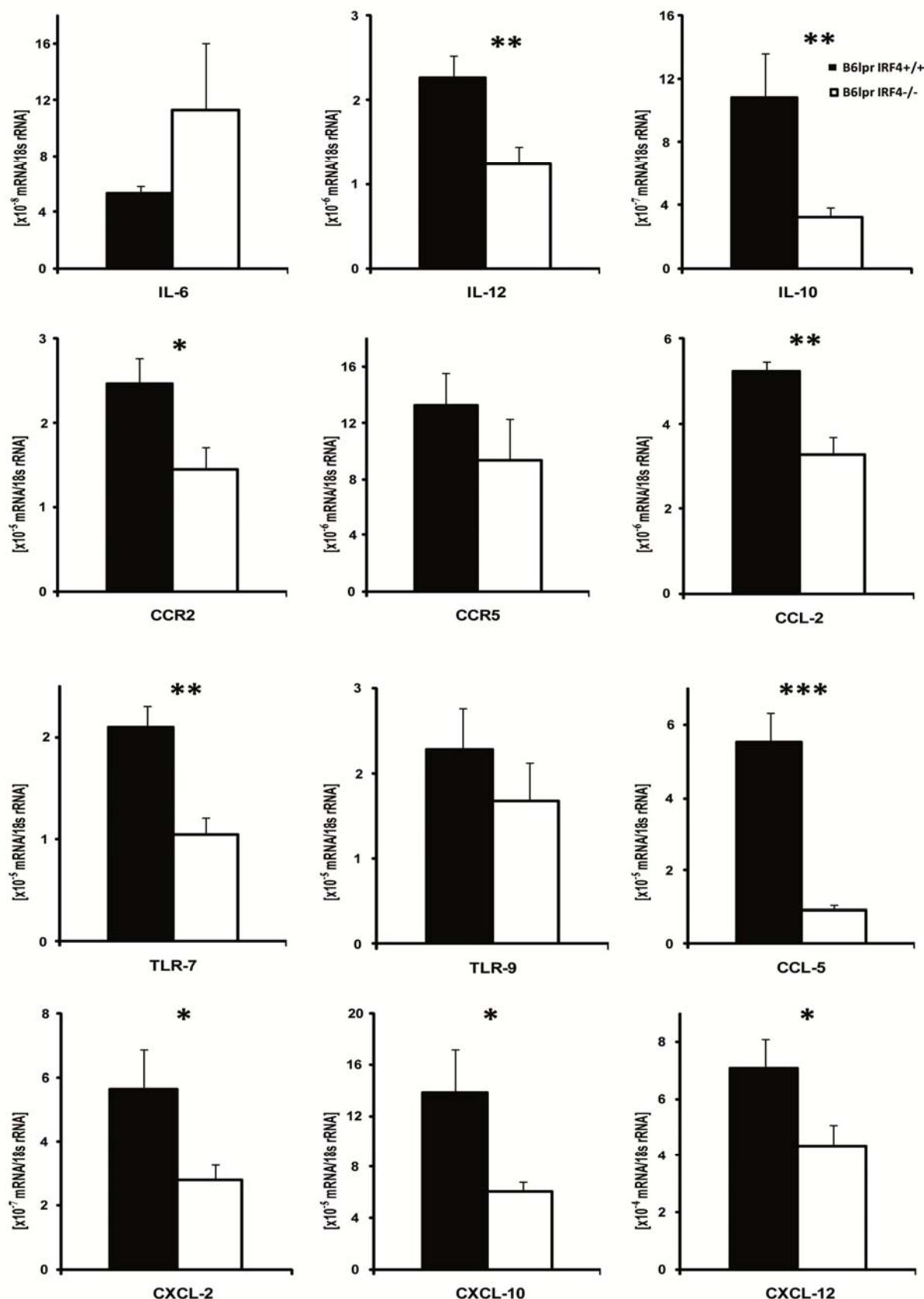


Abbildung 3-12 intrarenale mRNA-Expression verschiedener Zytokine, TLR- und Chemokinrezeptoren
real-time PCR-Analysen aus Nierenhomogenisaten; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001
 Werte sind Mittelwerte +/- SEM

Um zu untersuchen, ob der Effekt der *Irf4*-Defizienz möglicherweise auch von renalen Parenchymzellen vermittelt sein könnte, wurde die IRF4- und die IRF5- Expression in verschiedenen renalen Zelltypen bestimmt. Wie aus Abbildung 3-13 hervorgeht, war eine IRF4-Expression auf niedrigem Niveau nur in Tubulusepithelien nachweisbar (zum Vergleich DCs und PBMCs abgebildet), alle anderen renalen Zellen zeigten keine IRF4- und nur geringe IRF5-Expression. Der protektive Effekt der IRF4-Defizienz muss daher durch hämatopoetische Zellen vermittelt sein. Da insbesondere die verminderte intrarenale Chemokinexpression zu weniger Rekrutierung von APCs führen kann, wurden Nierenschnitte mit einem Antikörper gegen Mac2/Galectin-3, einem Marker proentzündlicher Makrophagen, gefärbt. Hier zeigte sich, in Einklang mit den chemotaktischen Milieus, ein hochsignifikant geringerer Makrophageninflux in die Nieren von B6^{lpr/lpr}/Irf4^{-/-} Mäusen (Mac-Score $1,475 \pm 0,101$ vs. $2,025 \pm 0,138$, $p<0,01$). Es zeigt sich also, dass die *Irf4*-Defizienz im B6^{lpr} Modell zu weniger APC-induzierter renaler Entzündung führt.

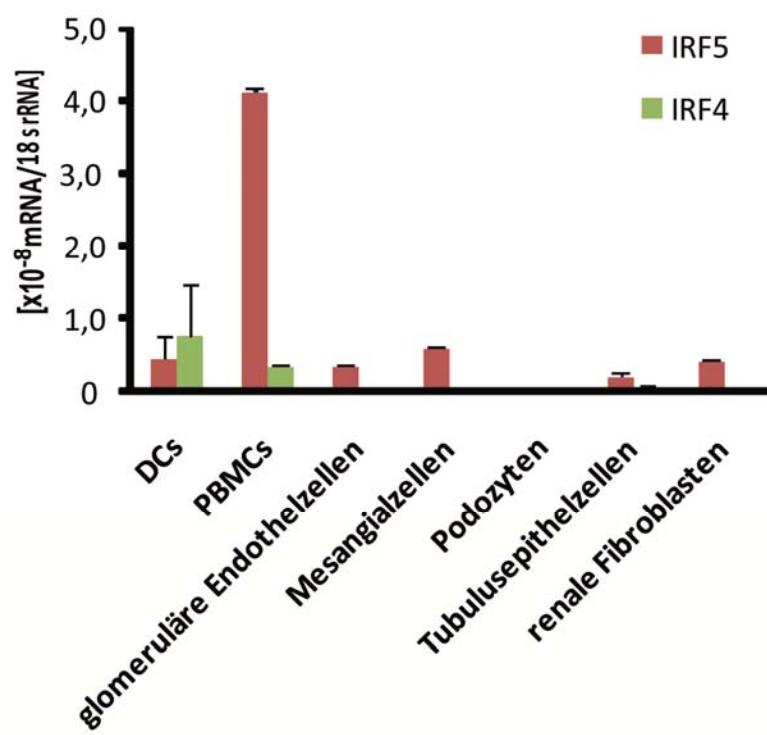


Abbildung 3-13 mRNA-Analyse der IRF4 und IRF5-Expression in verschiedenen renalen Zellpopulationen
real-time PCR-Analysen aus Zellisolaten verschiedener Nierenzellkompartimente und hämatopoetischen Zellen;
* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

3.4.2 $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäuse sind vor autoimmunem Lungenschaden geschützt

Aufgrund der Diskrepanz zwischen systemischer Entzündungsaktivität einerseits, weniger Nierenpathologie andererseits, stellte sich die Frage, ob die *Irf4*-Defizienz speziell die Nierenmanifestation des SLE verhindert oder allgemein zu weniger Organschaden führt. Eine weitere Manifestation des Autoimmunphänotyps von $B6^{lpr}$ Mäusen zeigt sich gewöhnlich in den Lungen, wo es zur Entstehung von peribronchialen und perivaskulären Immunzellinfiltraten kommt. Während diese Infiltrate bei $B6^{lpr/lrf4/+}$ Mäusen nachweisbar waren, fehlten sie, analog zur Situation in der Niere, bei $B6^{lpr/lrf4/-}$ Tieren komplett (Abbildung 3-14). $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäuse sind also generell vor den Organmanifestationen des SLE geschützt.

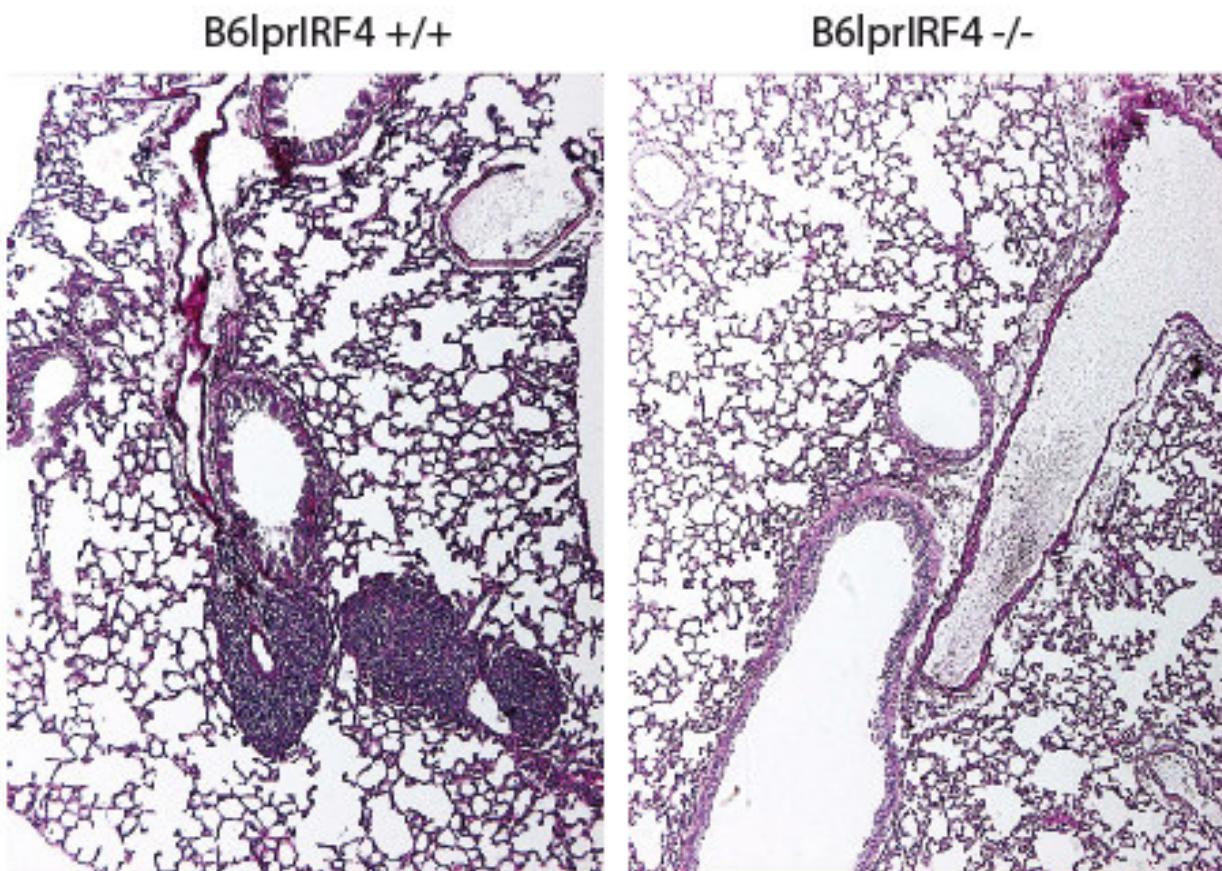


Abbildung 3-14 Peribronchiale Entzündung mit Leukozyteninfiltraten
Repräsentative Lungenhistologien nach *Irf4*-Genotyp; PAS-Färbung; Vergrößerung 100x

3.5 IRF4 und die Antikörperproduktion

3.5.1 IRF4-Defizienz schützt vor dem Auftreten von Autoantikörpern

Da in der Nierenhistologie die für den SLE typischen Immunkomplexe bei *Irf4*-defizienten B6^{*lpr*} Tieren nicht nachweisbar waren, wurden als nächstes die SLE-typischen Autoantikörper im Serum der Tiere untersucht. Eine auch in der Klinik breite Anwendung findende Screening-Untersuchung ist der Nachweis von ANAs in der Immunfluoreszenz anhand von Hep-2-Zellen. Wie in Abbildung 3-15 dargestellt, waren im Serum der B6^{*lpr/lrf4+/+*} Tiere ANAs in einem homogenen, nukleären Muster vorhanden (bis zu einer Verdünnung von 1:100 untersucht), während sie bei B6^{*lpr/lrf4-/-*} Mäusen bereits in einer Verdünnung von 1:40 nicht mehr nachweisbar waren.

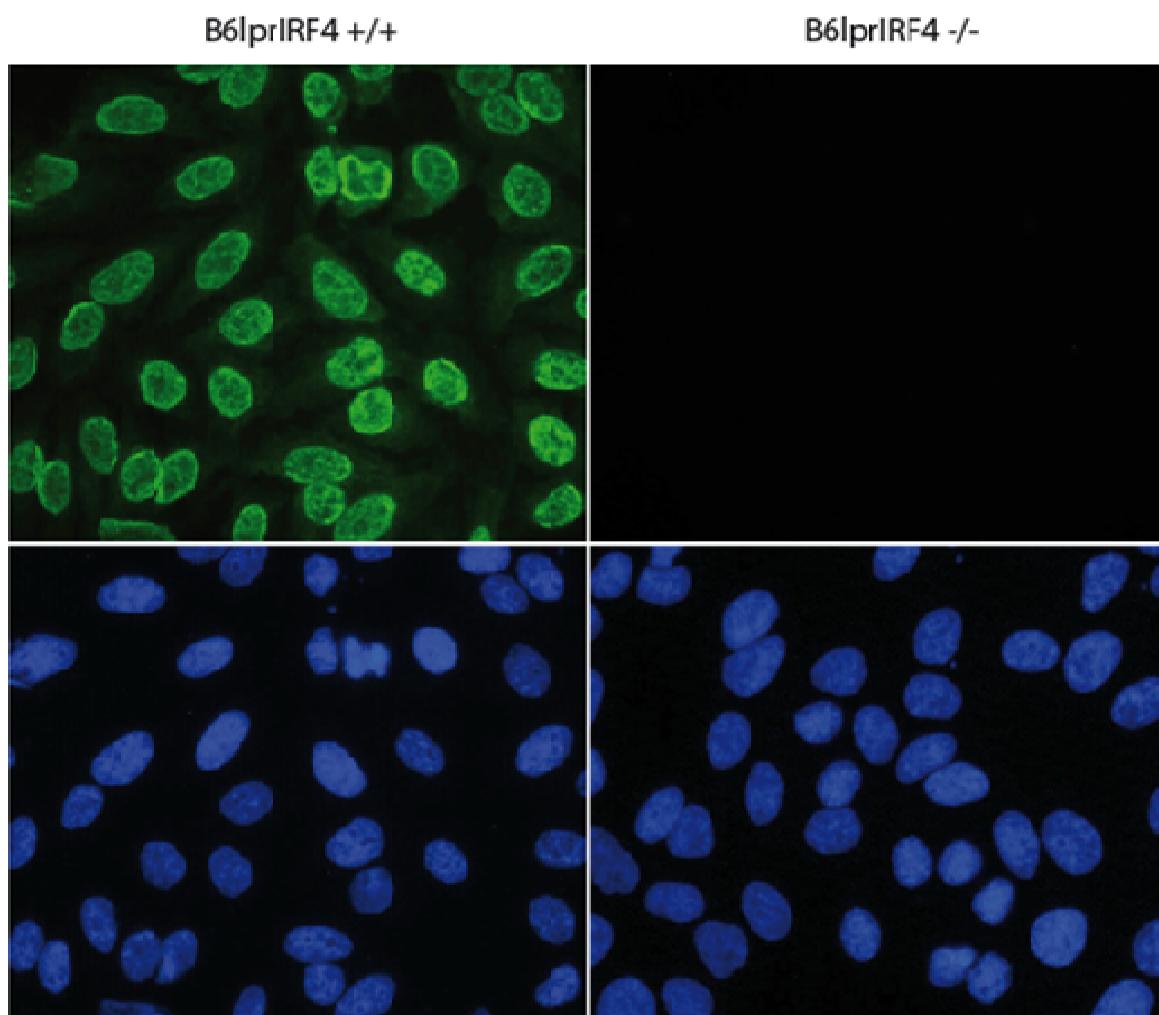


Abbildung 3-15 ANA-Screening mit Hep-2 Zellen

Fluoreszmikroskopische Aufnahmen seruminkubierter Hep-2 Zellen nach *Irf4*-Genotyp; DAPI-Gegenfärbung zur Kerndarstellung; Vergrößerung 800x

3.5.2 IRF4 reguliert die Serumantikörperkonzentration im B6^{Ipr} Modell

Da anhand des Fluoreszenz-Musters nicht auf die molekulare Zielstruktur der Autoantikörper geschlossen werden kann und im ANA-Screening auch nur Autoantikörper vom IgG-Typ erfasst werden, wurden als nächstes ELISAs zur Bestimmung der Konzentrationen von Doppelstrang-DNA-Antikörpern (anti-dsDNA-AKs) und anti-Smith-Antigen/u1snRNP-Antikörpern jeweils vom IgG- und IgM-Typ sowie der Gesamtantikörperkonzentration durchgeführt. Wie erwartet konnten im Serum von B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäusen keine IgG-Autoantikörper detektiert werden. Es zeigte sich auch, dass in *Irf4*-defizienten Tieren die Gesamtkonzentration von IgG-Antikörpern im Vergleich zu *Irf4*-Wildtyp Tieren stark vermindert war. Auch die Konzentration von IgM-Antikörpern im Serum von B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäusen war vergleichsweise niedrig, wobei sich hier deutliche interindividuelle Unterschiede fanden. Autoantikörper vom IgM-Typ waren auch bei *Irf4*-defizienten Tieren nachweisbar, allerdings in signifikant niedrigeren Konzentrationen als bei *Irf4*-Wildtyp Tieren.

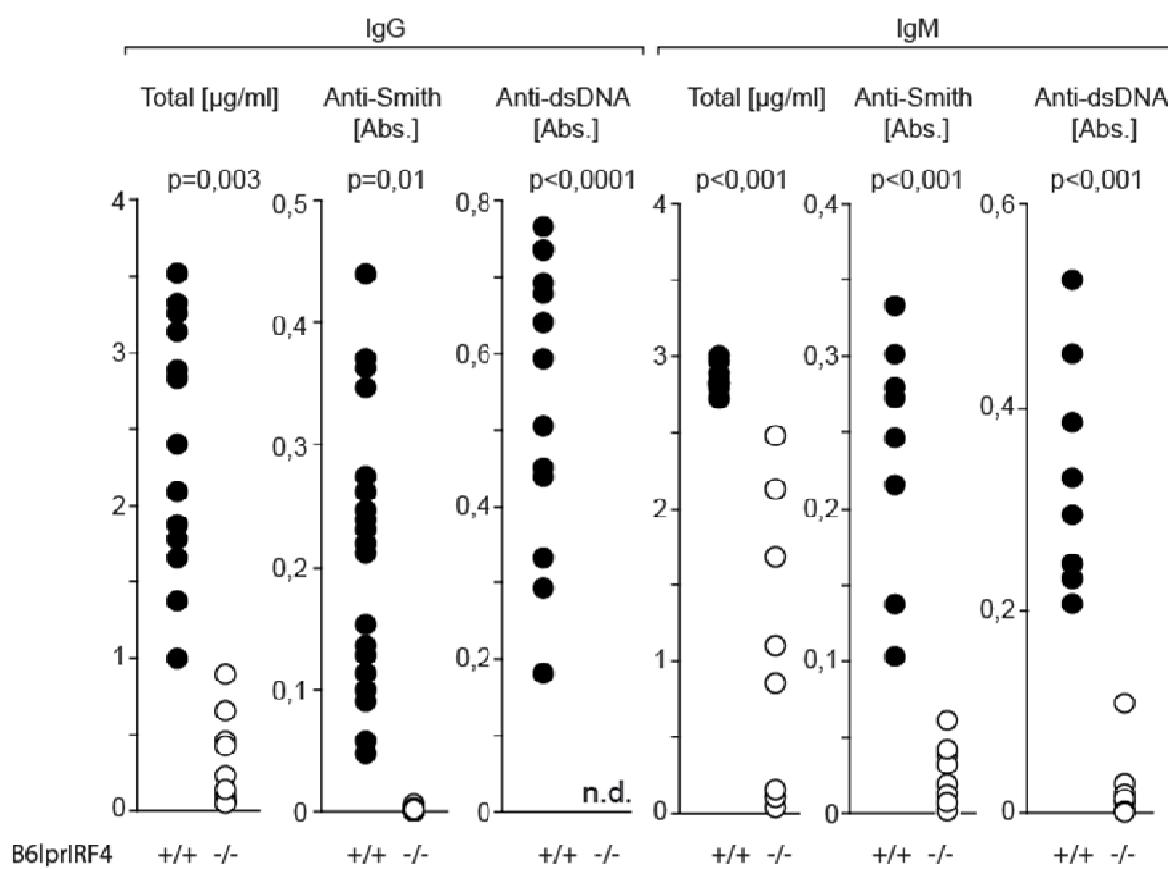


Abbildung 3-16 Serumkonzentrationen von Gesamtantikörpern und ausgewählten Autoantikörpern
ELISA-Messungen der SLE-spezifischen und gesamten Antikörperkonzentrationen im Serum; Konzentrationen für Gesamt IgG und IgM in µg/ml; bei SLE-Autoantikörpern absolute OD-Werte

3.6 IRF4 vermittelt Plasmazelldifferenzierung im B6^{lpr} Tiermodell

Aufgrund des ausgeprägten Phänotyps der von B6^{lpr/lrf4-/-} Tiere in Hinblick auf die Antikörperproduktion lag die Hypothese nahe, dass die IRF4-Defizienz im B6^{lpr} Tiermodell die Plasmazellbildung beeinträchtigt. Zunächst wurde deshalb immunhistologisch die Gewebearchitektur der Milz untersucht (Abbildung 3-17). Hier fand sich abhängig vom *Irf4*-Genotyp kein Unterschied und das histologische Bild war vereinbar mit einer normalen Milzgewebsarchitektur. Um einen etwaigen Defekt in der B-Zell-Ausreifung bis zur Plasmazelle festzustellen, wurden als nächstes die verschiedenen B-Zell-Subtypen in der Milz mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass sich B6^{lpr} Mäuse hinsichtlich des *Irf4*-Genotyps in den Zellzahlen weder für B-Zellen insgesamt noch bei den reifen B-Zellen unterschieden. Interessanterweise war aber eine Verschiebung bezüglich des Verhältnisses von Follikel-assoziierten B-Zellen (FoBCs) zu B-Zellen der Marginalzone (MZBC) zugunsten der MZBCs in B6^{lpr/lrf4-/-} Mäusen zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied abhängig vom IRF4-Genotyp bestand auch im Anteil der Keimzentrums-B-Zellen (GCBCs) (nicht aber deren Gesamtzahl), was auf eine leichte Störung der Keimzentrumsreaktion und damit der Plasmazellbildung hindeutet. Tatsächlich konnte subsequent gezeigt werden, dass die Zahl der Plasmazellen in B6^{lpr/lrf4-/-} Mäusen stark reduziert ist. Da B6^{lpr/lrf4-/-} Mäuse aber trotz der gestörten Keimzentrumsreaktion und bei fast vollständiger Abwesenheit von Plasmazellen eine gewisse Menge IgM-Antikörper produzierten, wurden zusätzlich die B1-Zellpopulationen der Milz und im Peritonealraum analysiert, um die Möglichkeit zu prüfen,

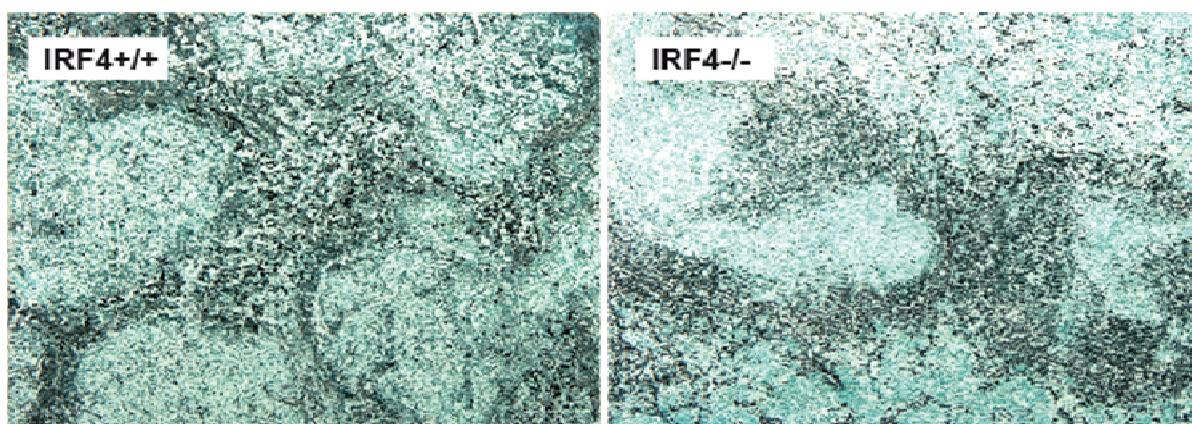


Abbildung 3-17 Unabhängig vom *Irf4*-Genotyp erhaltene Follikel-Architektur der Milz
Repräsentative Immunhistologien nach *Irf4*-Genotyp; anti-IgM Färbung; Vergrößerung 100x

dass diese Zellen die Quelle der im Serum detektierten IgM-Antikörper waren. Tatsächlich gab es in der Milz einen Trend zu mehr B1-Zellen bei in $B6^{lpr/lrf4^{-/-}}$ Tieren, im Peritonealraum erreichte diese Differenz statistische Signifikanz (Abbildung 3-18). Die Differenzierung von reifen B-Zellen zu Plasmazellen steht unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors PRDM1/Blimp-1. Um die defizitäre Plasmazellbildung in $B6^{lpr}$ Mäusen genauer zu analysieren, wurden daher u.a. die mRNA-Expression dieses Markers in CD19+ Splenozyten untersucht. Wie in Abbildung 3-19 dargestellt zeigte sich, dass IRF4 auch im $B6^{lpr}$ Modell

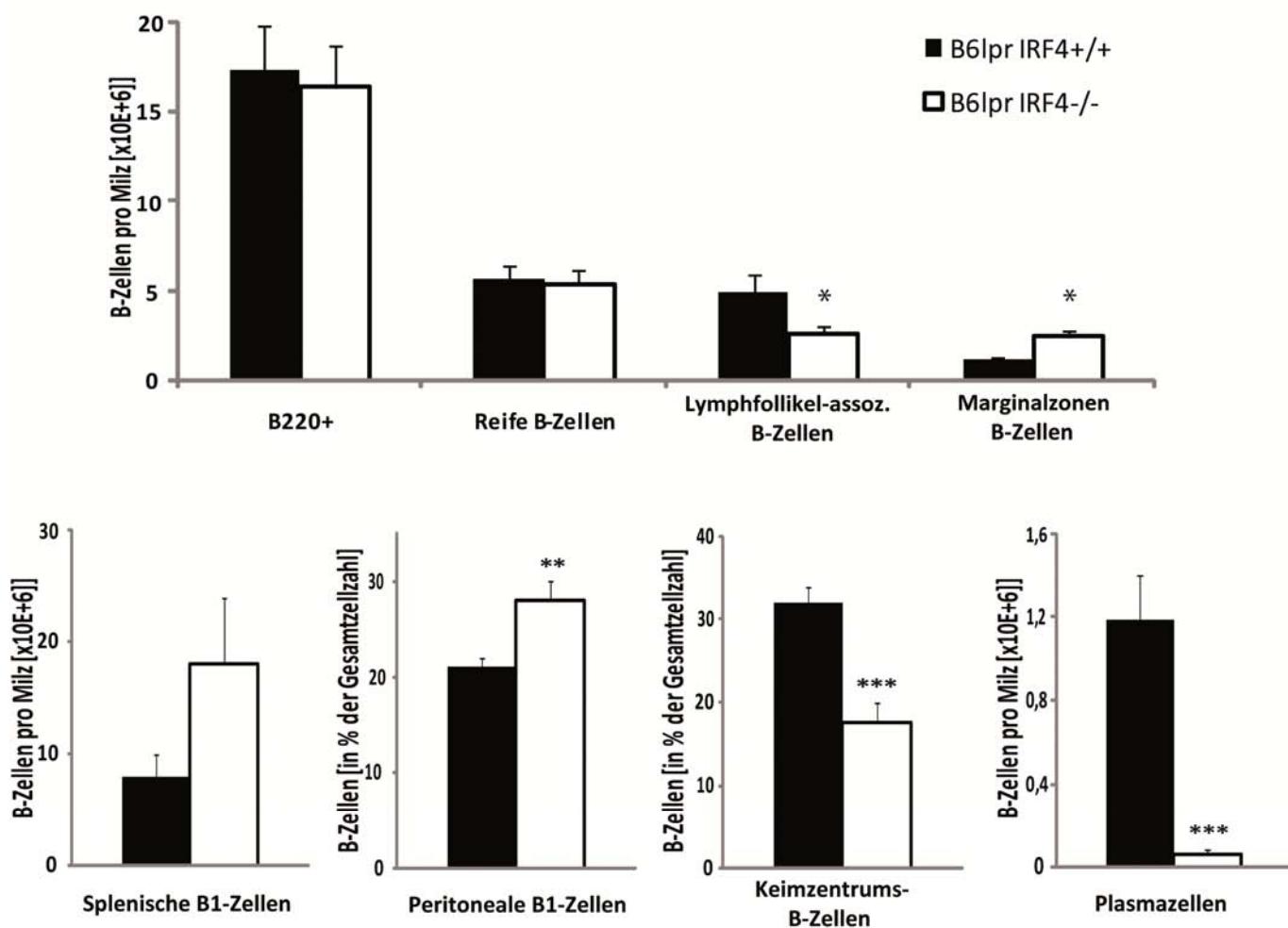


Abbildung 3-18 B-Zell-Subpopulationen in der Milz und in Peritoneum

Durchflusszytometrische Untersuchung von EinzelzellSuspensionen aus Milz und Peritoneum;
* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0,001$; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

notwendig ist, um in CD19+ B-Zellen PRDM1/Blimp-1 zu induzieren. BCL6, ein weiterer Transkriptionsfaktor, ist für die Bildung von Keimzentren von Bedeutung. Hier fand sich allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen B6^{lpr/lrf4-/-} und B6^{lpr/lrf4-/-} Tieren. *Irf4*-defiziente B6^{lpr} Mäuse zeigen also einen komplexen B-Zell-Phänotyp, der durch das Fehlen von Plasmazellen, eine Verschiebung von FoBCs zu MZBCs sowie eine Akkumulation splenischer B1-Zellen charakterisiert ist.

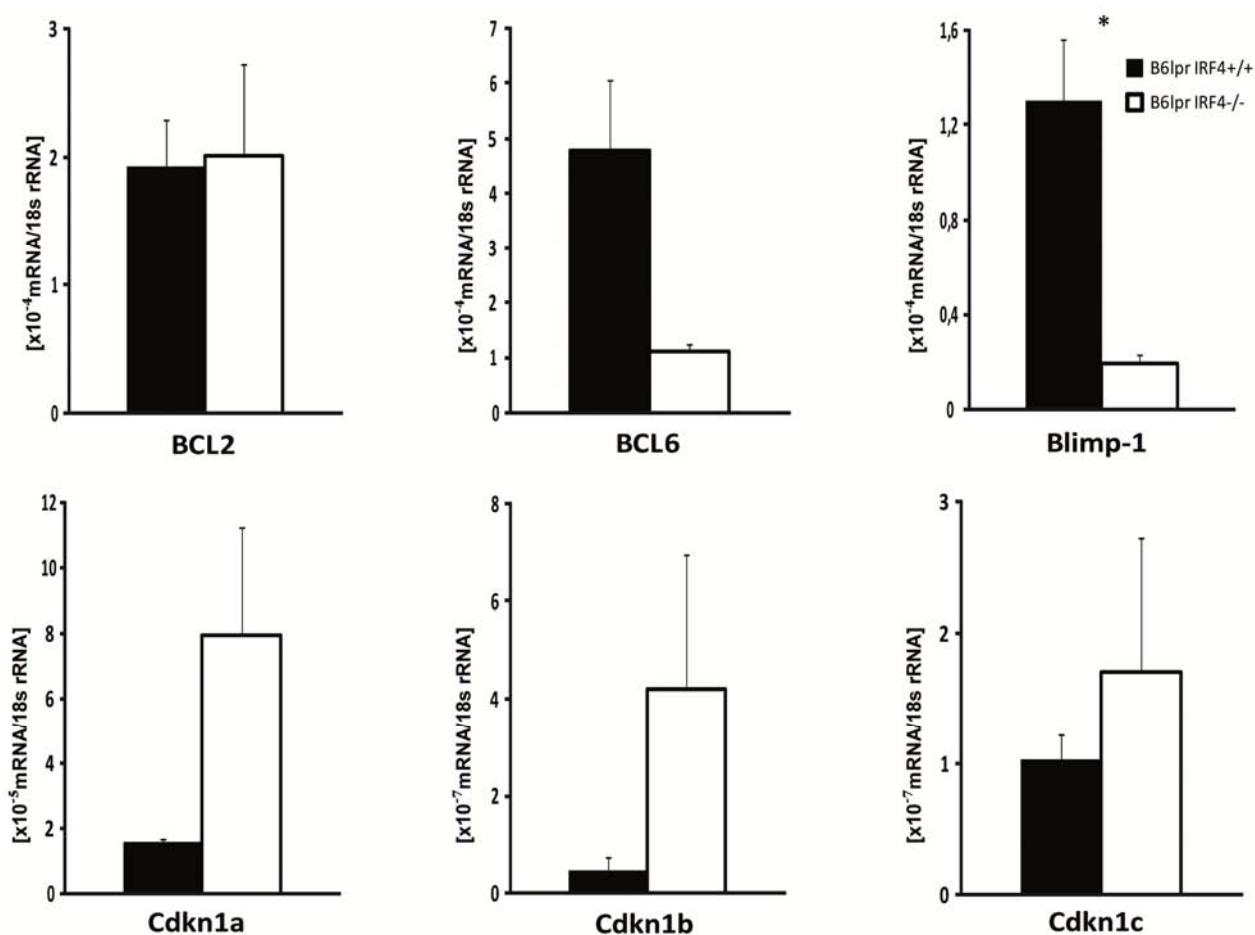


Abbildung 3-19 mRNA-Expression in CD19+ Splenozyten

real-time PCR-Analysen nach CD11c+Zellisolation aus der Milz; *p<0.05 ; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

3.7 IRF4 reguliert T-Helferzell-Differenzierung im B6^{lpr} Tiermodell

Da die effektive Ausreifung von B-Zellen zu Plasmazellen von T-Helferzellen abhängt und für den SLE auch eine Rolle insbesondere von Antigen-spezifischen Th-1- und Th17- Helferzellen beschrieben ist, wurden ebenfalls T-Zell-Subpopulationen in der Milz durch-flusszytometrisch analysiert. Wie in Abbildung 3-21 dargestellt, zeigte sich zwischen B6^{lpr/lrf4-}/⁻ und B6^{lpr/lrf4+/+} Mäusen kein Unterschied in der Gesamtzellzahl von CD3+-T-Zellen. In *Irf4*- Wildtyp Tieren gab es einen kleinen, aber signifikanten Überschuss von CD8+ zytotoxischen T-Zellen gegenüber *Irf4*-defizienten Tieren, bei denen sich hingegen signifikant mehr regulatorische T-Zellen fanden. Bei genauerer Betrachtung der T-Helferzell-Subtypen fand sich in B6^{lpr/lrf4-}/⁻ Mäusen eine deutliche Reduktion der Th1- und Th17- Helferzellen. Dies bestätigte sich auch in einer mRNA-Expressionsanalyse splenischer T-Zellen, die in B6^{lpr/lrf4-}/⁻ Tieren signifikant weniger Tbet-mRNA produzierten, ein spezifischer Transkriptionsfaktor von Th1-Helferzellen. Für Gata3, den Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor fand sich dagegen kein signifikanter Unterschied abhängig vom *Irf4*-Genotyp (Abbildung 3-20). Da in den Splenozytenstimulationsexperimenten die starke erhöhte Produktion von IFN-γ in B6^{lpr/lrf4-}/⁻ Splenozyten aufgefallen war, einem Typ-2 IFN, das eher dem adaptiven Immunsystem, insbesondere Th1-Helferzellen zugeschrieben wird, gerade dieser Zelltyp aber in B6^{lpr/lrf4-}/⁻ Mäusen vermindert war, wurde eine alternative

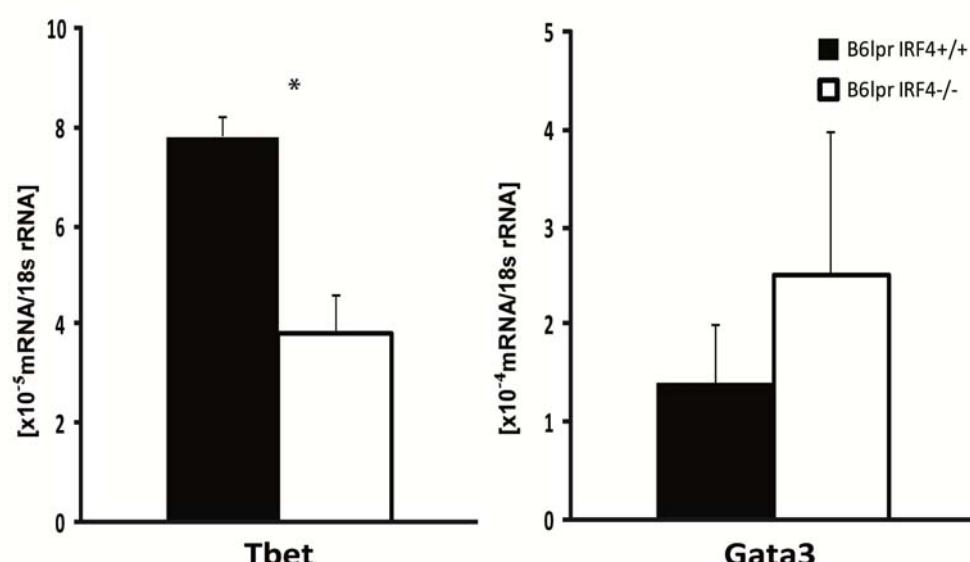


Abbildung 3-20 mRNA-Expression in splenischen T-Zellen

real-time PCR-Analysen nach CD11c+Zellisolation aus der Milz; *p<0.05; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

Quelle der IFN- γ Produktion gesucht und in NK-Zellen, die bei *Irf4*-defizienten Tieren vermehrt waren, identifiziert. B6^{lpr/lpr Irf4-/-} Mäuse weisen also zusätzlich zu den B-Zell-Defekten auch einen T-Zell-Phänotyp auf, wobei hier CD8-positive zytotoxische T-Zellen, Th1- und Th17-Zellen vermindert, T_{reg}-Zellen jedoch vermehrt sind.

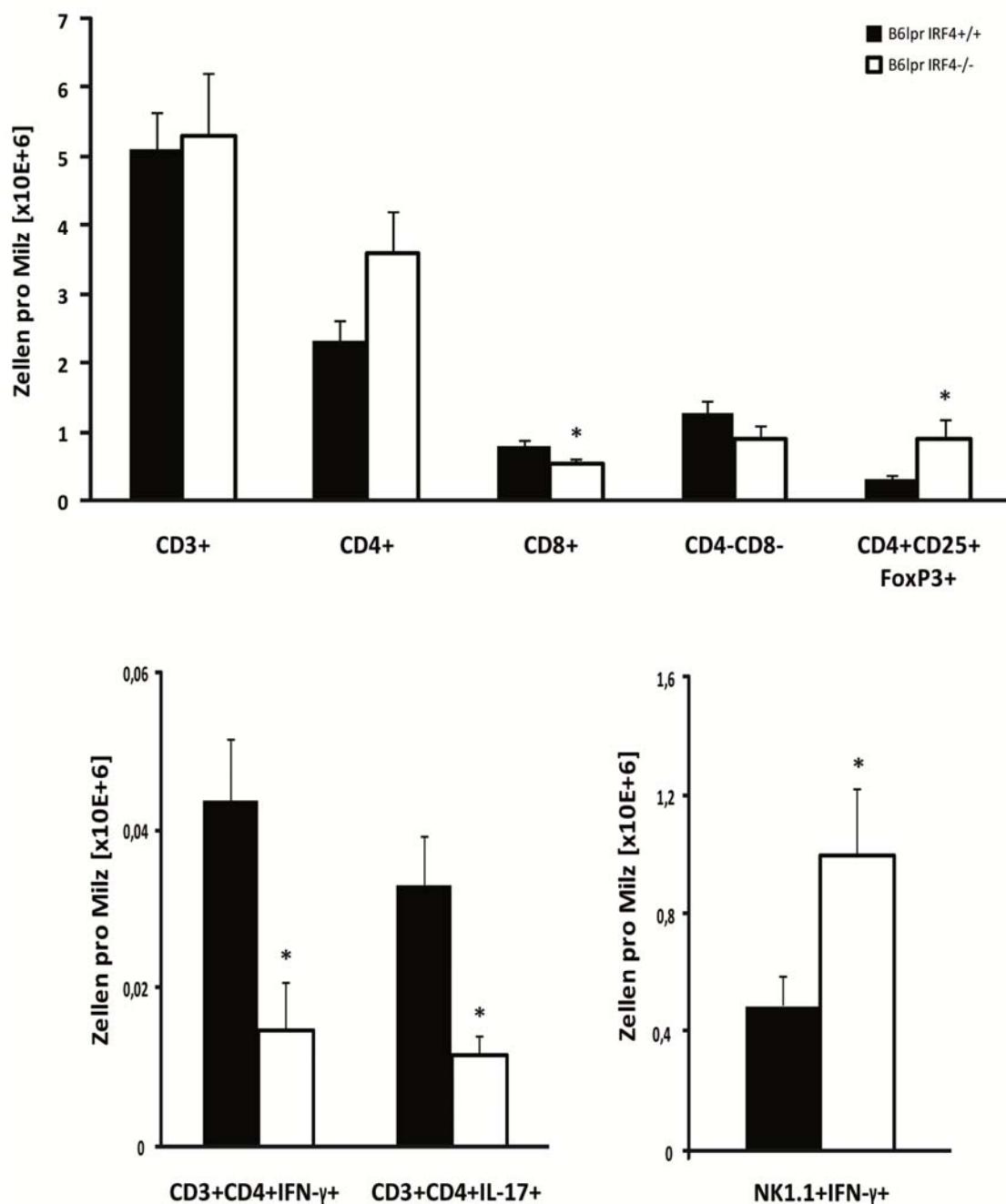


Abbildung 3-21 T-Zell-Subpopulationen in der Milz

Durchflusszytometrische Untersuchung von EinzelzellSuspensionen aus Milz und Peritoneum; *p<0.05 ; Werte sind Mittelwerte +/- SEM

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von IRF4 in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses zu untersuchen. Wir vermuteten, dass die IRF4-Defizienz zu einem agravierten Verlauf des SLE führt. Evidenz für diese Hypothese kommt aus der bekannten Rolle verschiedener anderer Mitglieder der IRF-Familie (Reilly et al., 2006) (Marshak-Rothstein and Rifkin, 2007) (Baccala et al., 2013) und der TLR-Signalwege allgemein (Anders, 2009) in der molekularen Pathogenese des SLE. Insbesondere IRF5 ist entscheidend an der Entstehung des SLE beteiligt. So führt IRF5-Defizienz in verschiedenen Mausmodellen zu deutlicher Verbesserung des Phänotyps (Richez et al., 2010; Tada et al., 2011) und es konnte gezeigt werden, dass einzelne IRF5-Polymorphismen stark mit humanem SLE assoziiert sind (Graham et al., 2006; Graham et al., 2007; Hom et al., 2008). Da IRF4 im TLR-Signalweg antagonistisch zu IRF5 wirkt (Negishi et al., 2005), war es daher naheliegend, die Funktion dieses IRFs bei der Pathogenese des SLE zu untersuchen. Nachdem unter anderem Lassen et al. zeigen konnten, dass die IRF4-Defizienz durch IRF5-Disinhibierung über eine unkontrolliert pro-entzündlicher Aktivität renaler DCs bei Ischämie/Reperfusion zu verstärkter Nierenschädigung führt (Lassen et al., 2010), hypothetisierten wir analog dazu eine Aggravation der Krankheitsaktivität im SLE-Modell. Entgegen dieser Erwartung zeigte sich aber *de facto* eine vollständige Protektion IRF4-defizienter B6^{lpr} Mäuse. Wie kommt es zu diesem scheinbaren Widerspruch? IRF4-Defizienz führt zu einer unkontrollierten Aktivität des innaten Immunsystems, was wir auch im B6^{lpr} Modell zeigen konnten. Für die Pathogenese des SLE und den Endorganschaden sind aber die Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems entscheidend. Hierbei kommt es durch die IRF4-Defizienz sowohl zu intrinsischen B- und T-Zell-Defekten, sodass selbst bei gesteigerter systemischer Entzündung keine Autoimmunantwort generiert werden kann. Auf die Frage, wie es zu diesen unterschiedlichen Wirkungen IRF4s im innaten und adaptiven Immunsystem kommt, soll nun eingegangen werden.

4.1 Systemische Entzündung in B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäusen

Im Rahmen der Phänotypisierung der von uns generierten B6^{Ipr/Irf4-/-} Tiere schien sich anhand verschiedener Zytokinmarker der systemischen Entzündung zunächst unsere Ursprungshypothese zu bestätigen. So war die Plasmakonzentration der pro-entzündlichen Zytokine TNF- α und IL-12 bei IRF4-defizienten Tieren erhöht. Es ist bekannt, dass insbesondere der IL-12 Spiegel im B6^{Ipr} Modell mit der SLE-Aktivität korreliert (Lech et al., 2011a; Lech et al., 2008). Interessanterweise war die Beobachtung nicht auf alle pro-entzündlichen Zytokine übertragbar, so fanden sich im Plasma keine *Irf4*-Genotyp-abhängigen Unterschiede bei den Konzentrationen von IL-6, CCL-2, IL-23 und IFN- γ , während die T-Zell-Zytokine IL-17 und IL-21 signifikant höhere Plasmaspiegel in *Irf4*^{+/+} Tieren aufwiesen. Wie kommt es zu diesen Unterschieden? Da insbesondere TNF- α und IL-12 unter der transkriptionellen Kontrolle von IRF5 stehen (Takaoka et al., 2005), deuten unsere Ergebnisse zumindest im B6^{Ipr} SLE-Modell auf eine spezifische *in vivo* Rolle von IRF4 im IRF5-Signalweg hin, während der NFkB-Signalweg *in vivo* unabhängig von IRF4 ist. Diese Ergebnisse stehen auch in Einklang mit den Ergebnissen von (Negishi et al., 2005) und (Honma et al., 2005), die jeweils für CpG-DNA- und LPS-induziertes Organversagen in IRF4-defizienten Tieren einen agravierten Phänotyp beschreiben, der zumindest im Fall des LPS-induzierten Modelles TNF- α -vermittelt ist. Obwohl IRF4 sowohl in der M2-Polarisierung via Jmjd3 eine nicht redundante Rolle spielt (Satoh et al., 2010) und auch für die Th2-Polarisierung von T-Zellen durch die IL-4-abhängige Gata3-Induktion benötigt wird (Lohhoff et al., 2002), unterscheiden sich die IL-4 Plasmakonzentrationen von B6^{Ipr/Irf4+/+} und B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäusen nicht. Was ist der Stimulus für die Synthese der pro-entzündlichen Zytokine im B6^{Ipr} Modell und welche Zellen sind an der Produktion der jeweiligen Zytokine beteiligt? Die Rolle der IRFs im TLR-Signalweg deutet auf TLR-Agonisten als Stimulus hin, hier sind speziell von Darmbakterien produziertes, in die Blutbahn eingeschwemmtes LPS (via TLR4) (Tacke and Zimmermann, 2014) als auch, besonders beim SLE, endogene Nukleinsäuren (via TLR7 und TLR9) (Anders, 2009) von Bedeutung. Tatsächlich produzieren B6^{Ipr/Irf4-/-} Splenozyten nach TLR4-Stimulation mehr IL-6, IL-12, CCL-2, INF- γ und TNF- α als die IRF4-kompetenten Kontrollzellen, wobei die Produktion von IL-6 und TNF- α auch ohne TLR-Stimulation (i.e. in der Mediumkontrolle) signifikant erhöht ist. Bei Stimulation der in der SLE-Pathogenese involvierten Rezeptoren TLR7 und TLR9 zeigen sich aber diskordante Ergebnisse, da in

diesem Fall IRF4-kompetente Splenozyten mehr IL-6 und insbesondere TNF- α produzieren, IRF4-defiziente Splenozyten aber mehr anti-entzündliches IL-10. Der unterschiedliche Effekt des *Irf4*-Genotyps in verschiedenen TLR-Signalwegen (TLR4 vs. TLR7/TLR9) kann dabei mehrere Ursachen haben: 1) IRF4 hat je nach Signalweg tatsächlich eine entweder fördernde oder inhibierende Rolle. Generell wurden in der vorliegenden Arbeit Zytokinspiegel nach 24h Stimulation gemessen, sodass neben der zytosolischen Funktion IRF4s durch Blockierung der IRF5-Bindestelle an MyD88 auf Proteinebene (Negishi et al., 2005) auch ein nuklearer Effekt IRF4s als Transkriptionsfaktor möglich wäre. Dagegen spricht jedoch, a) dass in anderen Arbeiten, in denen die TLR-Ligation in entweder IRF4- und IRF5-defizienten Zellen verglichen wurden, der Phänotyp auch nach 24h jeweils genau spiegelbildlich war (Honma et al., 2005; Negishi et al., 2005), b) der Mechanismus der IRF4-vermittelten IRF5-Inhibition genau bekannt ist und c) IRF5 in allen TLR-Signalwegen konkordant eine pro-entzündliche Funktion hat (Takaoka et al., 2005). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen sind allerdings unabhängig vom *Irf4*-Genotyp für den Fas-Rezeptor defizient. Analog zur Situation in B- und T-Zellen kann eine Fas-Rezeptor-Aktivierung auch in DCs zum apoptotischen Zelltod führen (Stranges et al., 2007), zusätzlich wurde vor kurzem gezeigt, dass der Fas-Rezeptor in DCs auch an der Induktion eines immunsuppressiven Phänotyps beteiligt ist (Qian et al., 2013). Es besteht daher die Möglichkeit, dass Fas-defiziente APCs ein grundsätzlich anderes Expressionsprofil als die in den Vergleichsarbeiten verwendeten Fas-kompetenten APCs haben und dieses veränderte Profil TLR-spezifische, differentielle IRF4-Funktionen vermittelt. 2) IRF4 hat in verschiedenen Zelltypen eine unterschiedliche Funktion. Da Splenozyten eine heterogene Zellpopulation aus B-Zellen, T-Zellen, MΦs und DCs darstellen, wurde versucht, *in vitro* generierte BMDCs und PBMCs (laut Herstellerangabe in der Maus vor allem Lymphozyten) ebenfalls mit TLR-Agonisten zu stimulieren und so eine mögliche zelltypspezifische Rolle von IRF4 zu definieren. Bei Verwendung nativer, IRF4-defizienter APCs lassen sich die gemachten Beobachtungen allerdings nicht ohne weiteres auf *in vitro* generierte APCs übertragen (Negishi et al., 2005), da die stimulierte Ausreifung mit jeweils nur einem Differenzierungsfaktor (z.B. GM-CSF oder s-Flt3) die komplexen *in vivo* Bedingungen nicht hinreichend genau wiederspiegelt (Levine and Tjian, 2003). *De facto* zeigte sich, dass BMDCs in Hinblick auf IL-6, IL-12 und TNF- α ein ähnliches Verhalten zeigten wie Gesamtsplenozyten. Dies gilt allerdings nicht für die CCL-2 und die CXCL-10 Produktion. Da PBMCs bezüglich des

Irf4-Genotyps generell keinen Unterschied bei TLR4 Stimulation zeigten, liegt es nahe, dass IRF4 im TLR4-Signalweg von PBMCs keine relevante Rolle spielt. Diese Ergebnisse sprechen bei oben genannter Einschränkung dafür, dass IRF4, zumindest im B6^{lpr} Modell, zelltypspezifische Funktionen in TLR-Signalwegen hat. 3) Die relative und absolute Häufigkeit einzelner Zelltypen und damit auch deren Produktion von Zytokinen ist abhängig vom *Irf4*-Genotyp. Tatsächlich haben viele Arbeiten gezeigt, dass IRF4 eine wichtige Rolle in der Ausreifung verschiedener DC-Subsets spielt. So haben IRF4-defiziente Mäuse eine erniedrigte Anzahl an pDCs sowie an CD8α-negativen cDCs (Merad et al., 2013). Erstaunlicherweise sind CD11c-positive Zellen bei IRF4-Defizienz im B6^{lpr} Modell vermehrt, wobei dies vor allem auf der gesteigerten Frequenz von CD8α-negativen DCs basiert. Dieses Ergebnis steht in scharfem Kontrast zu den Ergebnissen von Suzuki et al., die bei IRF4-defizienten Tieren eine 90% Reduktion der CD8α-negativen DCs gefunden haben (Suzuki et al., 2004). Da in dieser Arbeit auch die Expression von MHCII auf DCs stark vermindert war, die CD11c-positiven Zellen von B6^{lpr/Irf4-/-} Mäusen aber reguläre Anzeichen der Aktivierung inkl. MHCII-Expression zeigen, scheint die konkomitante Fas-Deletion den DC-Phänotyp der solitären Irf4-Defizienz zu revertieren. Ebenfalls deutlich vermehrt finden sich Makrophagen in B6^{lpr/Irf4-/-} Mäusen, wobei diese Vermehrung sowohl M1- als auch M2-polarisierte Makrophagen nachweisbar war. Gerade das Vorhandensein von M2-Makrophagen ist hierbei hervorzuheben, da die Jmjd3-Irf4-Achse als essentiell für die M2-Polarisierung gilt (Satoh et al., 2010). Auch die mRNA-Expressionsanalyse bestätigte die Expression verschiedener M2-Marker, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit dafür sprechen, dass zumindest im B6^{lpr} Modell IRF4 für die M2-Polarisierung von Makrophagen nicht essentiell ist. Nicht explizit untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit die Frequenz und der Aktivierungszustand von pDCs. Da diese Zellen insbesondere TLR7 und TLR9 exprimieren (Kawai and Akira, 2010), liegt die Vermutung nahe, dass pDCs entscheidenden Anteil an der TLR7 und TLR9-vermittelten Zytokin-Produktion haben. Da pDCs nach Aktivierung weiter zu cDCs differentieren (Reizis et al., 2011) und die CD11c-positiven Zellen insgesamt bei IRF4-Defizienz mehr aktiviert waren, ist die Aktivierungs-induzierte pDC-Depletion eine mögliche Ursache für die höhere TLR7/TLR9-abhängige Zytokin-Produktion in IRF4-kompetenten B6^{lpr} Mäusen. So ist vor kurzem gezeigt worden, dass IRF4 das Überleben von CD8+ Effektor-T-Zellen nach Aktivierung vermittelt (Man et al., 2013) und es ist vorstellbar, dass IRF4 eine ähnliche Rollen in pDCs hat. Die durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten zeigt

zudem eine gesteigerte Frequenz von IFN- γ -produzierenden NK-Zellen in B6^{*lpr/lrf4-/-*} Tieren, während IFN- γ -positive T-Zellen hier vermindert sind, sodass die nur in Splenozyten, nicht aber in BMDCs nach LPS-Stimulation detektierbare IFN- γ -Produktion von NK-Zellen ausgeht. Da die mRNA-Analyse von frischen *ex vivo* CD11c-positiven Zellen für IL-6 und TNF- α im Gegensatz zu den *in vivo* gemessenen Plasmakonzentrationen höhere Expression in B6^{*lpr/lrf4+/-*} Mäusen zeigt, spricht einiges dafür, dass eher die in ihrer Zahl und Aktivierung vermehrten CD11b-positiven Makrophagen als CD11c-positiven DCs an der *in vivo* gesteigerten Produktion pro-entzündlicher Zytokine in B6^{*lpr/lrf4-/-*} Mäusen beteiligt sind. Im B6^{*lpr*} Modell sind also die vorbeschriebenen quantitativen und qualitativen DC- und M2-Polarisierungsdefekte bei IRF4-Defizienz nicht vorhanden, was für eine Rolle des Fas-Rezeptors in der DC-Ausreifung und Aktivierung sowie der M2-Polarisierung spricht.

Trotz der gesteigerten systemischen Entzündung bleibt festzuhalten, dass nach TLR-Stimulation sowohl in IRF4-defizienten Splenozyten als auch BMDCs die Produktion von IL-10 erhöht ist. IL-10 ist ein anti-entzündliches Zytokin, das von APCs und T_{reg}-Zellen produziert wird und Immunantworten auf verschiedenen Ebenen effektiv unterdrückt (Banchereau et al., 2012). Die vermehrte IL-10 Produktion ist insofern erstaunlich, da bekannt ist, dass die IL-10 Produktion von IL-12 gehemmt wird (Conroy et al., 2008). Auch wenn der Mechanismus der IL-12-resistenteren IL-10 Produktion gegenwärtig nicht bekannt ist, ist diese Beobachtung mit dem im Folgenden dargestellten völligen Verschwinden der SLE-Aktivität in B6^{*lpr/lrf4-/-*} Mäusen gut vereinbar.

4.2 Schutz vor Endorganschaden bei B6^{*lpr/lrf4-/-*} Mäusen

Während im Blut der B6^{*lpr/lrf4-/-*} Tiere eine verstärkte Entzündung nachweisbar war, konnte kein signifikanter Unterschied bei renalen Funktionsparametern nachgewiesen werden (Serumkreatinin, Albuminurie), die sowohl bei B6^{*lpr/lrf4-/-*} als auch B6^{*lpr/lrf4+/-*} Tieren im Normbereich lagen. Die Nieren- und Lungenhistologie bestätigte den Verdacht, dass in IRF4-defizienten Tieren die systemische Entzündung nicht zu mehr Organentzündung und – schaden führt. Es zeigte sich ein deutlich verminderter Influx von pro-entzündlichen Makrophagen in die Nieren der B6^{*lpr/lrf4-/-*} Mäuse und auch die intrarenale Produktion pro-entzündlicher Chemo- und Zytokine war hier gegenüber IRF4-kompetenten Tieren

erniedrigt. Interessanterweise zeigte sich auch in den Nieren kein Unterschied bei Markern, die mit der M2-Polarisierung von Makrophagen assoziiert sind. Neben der bekannten Tatsache, dass M1- und nicht M2-Makrophagen den Autoimmunschaden im SLE vermitteln (Weidenbusch and Anders, 2012), unterstreicht diese ebenfalls in der Milz gemachte Beobachtung, dass im $B6^{lpr}$ Modell IRF4 für die M2-Polarisierung vernachlässigbar ist. Da es in IRF4-defizienten Mäusen zur ungehemmten IRF5-vermittelten APC-Aktivität kommt (Honma et al., 2005; Lassen et al., 2010; Negishi et al., 2005) und IRF5 die Produktion von vielen der untersuchten Chemokine und Zytokine vermittelt (Barnes et al., 2002), sind diese Ergebnisse auf den ersten Blick kontraintuitiv. Wodurch kommt es also zum Schutz vor dem Autoimmunschaden in IRF4-defizienten $B6^{lpr}$ Mäusen? Es ist bekannt, dass verschiedene Mechanismen an der Pathogenese der Lupusnephritis beteiligt sind. Vielleicht der wichtigste Mechanismus ist die glomeruläre Ablagerung von Immunkomplexen und die dadurch ausgelöste Aktivierung von Mesangialzellen, Podozyten und des Komplementsystems (Bagavant and Fu, 2009). Da im humanen SLE das Auftreten von anti-dsDNA-AKs normalerweise sehr gut die Krankheitsaktivität reflektiert, während anti-Smith-Antigen-AKs mit der Nierenbeteiligung des SLE korrelieren (Rahman and Isenberg, 2008), wurden auch in $B6^{lpr/lrf4^{-/-}}$ Mäusen Autoantikörperspiegel bestimmt. Tatsächlich konnten diese weder im ANA-Screening noch in der ELISA-Differenzierung nachgewiesen werden, was allerdings mit einer insgesamt stark ausgeprägten Hypogammaglobulinämie in IRF4-defizienten $B6^{lpr}$ Mäusen einherging. Die von (Mittrucker et al., 1997) beobachtete vollständige Agammaglobulinämie wurde von uns allerdings nicht beobachtet. In Einklang mit der bekannten Beobachtung, dass die IRF4-induzierte Blimp-1 –Expression ein kritischer Schritt in der Plasmazelldifferenzierung ist (Klein et al., 2006), wurden auch in $B6^{lpr/lrf4^{-/-}}$ Mäusen keine Plasmazellen detektiert. Dieser Defekt basierte auch zum Teil auf der vorbekannten Störung der Keimzentrumsreaktion, da $B6^{lpr/lrf4^{-/-}}$ Mäuse einen geringeren Anteil an GCBCs aufwiesen. Die Fas-Defizienz mildert aber den beschriebenen Phänotyp eines vollständigen Fehlens der Keimzentren in IRF4-defizienten Mäusen (Bollig et al., 2012) deutlich, sodass die Gesamtzahl der GCBCs in $B6^{lpr/lrf4^{-/-}}$ Mäusen nicht reduziert ist. Welche Zellen produzieren die verbliebenen Immunglobuline, die in $B6^{lpr/lrf4^{-/-}}$ Tieren nachgewiesen werden können? In Einklang mit der oben ausgeführten und auch vorbekannten Beobachtung, dass die *Irf4*-Defizienz eine Überaktivität des innaten Immunsystems vermittelt, finden sich in den Milzen von $B6^{lpr/lrf4^{-/-}}$ Mäusen mehr MZBCs, die im Gegensatz zu FoBCs dem innaten Immunsystem

zugeordnet werden (Pillai and Cariappa, 2009). Eine weiteres innates B-Zell-Subset, sogenannte B1-Zellen können IgM-Immunglobuline produzieren und diese IgM-Produktion ist teilweise unabhängig von IRF4 (Holodick et al., 2010). Tatsächlich kommen in $B6^{lpr/lrf4/-}$ -Mäuse peritoneale B1-Zellen vermehrt vor und stellen die zelluläre Quelle der Rest-IgM-Produktion in diesen Tieren dar. Da das Repertoire dieser Immunglobuline allerdings beschränkt ist (Ochsenbein et al., 1999), kommt es dennoch nicht zum Auftreten von SLE-assoziierten Autoantikörpern. Interessanterweise gibt es sogar Hinweise, dass diese von B1-Zellen produzierten, sogenannten natürlichen Antikörper anti-entzündliche Eigenschaften haben und das Auftreten von Autoimmunkrankheiten aktiv verhindern (Vas et al., 2013). Ist der vorbekannte und von uns auch im $B6^{lpr}$ Modell verifizierte, wenngleich hier auch weniger ausgeprägte, intrinsische B-Zell-Defekt und das damit verbundene Fehlen von Autoantikörpern der einzige Schutzmechanismus in $B6^{lpr/lrf4/-}$ -Tieren? Auch wenn die NS-IC-vermittelte Pathologie im Zentrum der Lupusnephritis steht (Lech and Anders, 2013) und insbesondere im lpr-Modell des SLE (sowohl im MRL wie auch im C57/BL6 Hintergrund) einen zentralen Pathomechanismus darstellt, ist es bekannt, dass auch nicht NS-IC-assoziierte TLR-Stimulation (Anders and Schlondorff, 2007) und NS-IC unabhängige T-Zell-Aktivierung (Teichmann et al., 2013) zur Pathogenese der Lupusnephritis beitragen. Da weder IRF4 und IRF5 in renalen Parenchymzellen nennenswert exprimiert werden, ist ein Effekt der Irf4-Defizienz z.B. auf mesangiale TLR-Signalwege unwahrscheinlich. Es ist hingegen bekannt, dass IRF4 auch in der Differenzierung von Th-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. So ist bei IRF4-defizienten Tieren sowohl die Bildung von Th2-Zellen (Lohoff et al., 2002; Tominaga et al., 2003) wie auch Th17-Zellen (Biswas et al., 2010b) massiv vermindert. Kürzlich wurde zusätzlich gezeigt, dass auch CD8-positive Effektor-T-Zellen IRF4 benötigen, um effektive zytotoxische Aktivität zu generieren (Raczkowski et al., 2013). Dies ist im $B6^{lpr}$ Modell von besonderer Bedeutung, da die hier akkumulierenden CD4/CD8-doppelt negativen T-Zellen von CD8-positiven T-Zellen abstammen, die bei Fas-Defizienz nicht effizient eliminiert werden können und angenommen wird, dass diese DN-T-Zellen autoimmunen Organschaden vermitteln (Stranges et al., 2007). Die Frequenz der DN-T-Zellen unterschied sich zwischen IRF4-kompetenten und -defizienten $B6^{lpr}$ Mäusen nicht, jedoch waren die CD8-positiven T-Zellen in $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäusen vermindert. Während die vorbeschriebenen Th2-Defekte von uns anhand der Expression des Th2-Markers Gata3 in splenischen T-Zellen nicht beobachtet wurde, konnte gezeigt werden, dass $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäuse

sowohl den vorbekannten Th17-Zelldefekt aufwiesen, zusätzlich aber auch einen Mangel an Th1-Zellen. Da die Differentierung von Th1-Zellen in IRF4-defizienten Tieren in der Literatur als intakt beschrieben wird (Lohoff et al., 2002), könnten die von uns gemachten Beobachtungen mit der geringeren SLE-Aktivität in $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäusen zusammenhängen. Trotz einer gesteigerten systemischen Entzündungsreaktion werden ohne den SLE-Organschaden auch weniger Th1-Zellen gebildet. Dafür spricht, dass $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäuse mehr T_{reg} -Zellen produzieren, die Gesamtmenge CD4-positiver T-Zellen sich aber zwischen $B6^{lpr/lrf4/-}$ und $B6^{lpr/lrf4/+}$ Mäusen nicht unterscheidet, sodass die Th-Zell-Differentierung bei weniger SLE-Aktivität in Richtung T_{reg} -Zellen verschoben ist. Dagegen spricht jedoch, dass $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäuse hohe IL-12 Konzentrationen im Plasma aufweisen, ein Zytokin, unter dessen Wirkung naive CD4-positive T-Zellen effizient zu Th1-Zellen differenzieren (Baumjohann and Ansel, 2013). Eine weitere Möglichkeit ist, dass im Rahmen der Fas-Defizienz die IRF4-Defizienz eine andere Wirkung auf Th-Zellen ausübt und daher im $B6^{lpr}$ Modell Th1-, nicht aber Th2-Zellen vermindert vorkommen. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Gao et al. zu nennen. Es konnte gezeigt werden, dass der quantitative Th2-Defekt bei IRF4-Defizienz T-Zell extrinsisch durch das Fehlen IRF4-abhängiger DCs verursacht wird (Gao et al., 2013). Da bei $B6^{lpr/lrf4/-}$ Mäusen kein DC-Defekt nachgewiesen werden kann, erscheint es möglich, dass sich so auch die Th2-Zellfrequenzen und IL-4 Spiegel normalisieren. In Hinblick auf T-Zellen ist auch eine Arbeit von Lohhoff et al. erwähnenswert, die zeigt, dass IRF4-defizierte T-Zellen ausserordentlich sensibel für apoptotischen Zelltod sind (Lohhoff et al., 2004). Diese Arbeit weist damit ebenfalls darauf hin, dass durch die konkominante Fas-Deletion und die damit einhergehende Apoptose-Resistenz der Phänotyp von $B6^{lpr/lrf4/-}$ T-Zellen komplexer ist als im jeweilig solitären Knock-out. Für das $B6^{lpr}$ Modell konnten wir also zeigen, dass die IRF4-Defizienz mit weniger CD8-zytotoxischen, Th1- und Th17- T-Zellen, jedoch mit mehr T_{reg} -Zellen einhergeht.

4.3 Limitationen der Studie und Ausblick

Die vorliegende Studie hat einige wichtige Limitationen. Für die Experimente wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet und nur ein Zeitpunkt untersucht. Dieses Vorgehen ist für das B6^{Ipr} Modell am besten etabliert (Lech et al., 2011a; Lech et al., 2008; Lech et al., 2011b; Lech et al., 2010) und ermöglicht daher eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Aussagen über den Effekt der IRF4-Defizienz in männlichen Tieren oder den späten Krankheitsverlauf z.B. nach 12 oder 24 Monaten lassen sich aber daher anhand der vorgelegten Daten nicht treffen. Der Effekt der IRF4-Defizienz wurde in der vorliegenden Arbeit nur in einem Mausmodell des SLE untersucht. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen müsste die IRF4-Defizienz auch in anderen SLE-Modellen untersucht werden, z.B. in MRL^{Ipr} Mäusen oder im NZB/NZW F1-Modell. Um ein breiteres biologisches Verständnis der verschiedenen Vorgänge zu erlangen, müssten zusätzlich die jeweiligen solitären Knock-outs als Kontrollen mitgeführt werden, um in der Zusammenschau aller Genotypen die Funktionen von FAS und IRF4 sowie deren Zusammenspiel analysieren zu können. Eine weitere Limitation stellt die Art der genetischen Intervention dar. In dieser Arbeit wurde komplette Gen-KO Mäuse verwendet. Da IRF4 eine jeweils gegenteilige Rolle in der innaten und adaptiven Immunität einnimmt, ist eine wichtige offene Frage, wie sich die zelltypspezifische IRF4-Defizienz auf das B6^{Ipr} Modell auswirkt. Hierfür könnte einerseits ein zelltypspezifisches Cre-lox System (Sauer, 2002) verwendet werden, um IRF4 selektiv in DCs, MΦs, B- oder T-Zellen auszuschalten, andererseits wäre ein adoptiver Transfer IRF4-kompetenter Zellen in B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäuse denkbar. Der zweite Ansatz bietet die Möglichkeit, sowohl Fas^{Ipr} oder Fas^{wt} Irf4^{-/-} Zellen zu transferieren, um die Interaktion von FAS und IRF4 besser untersuchen zu können. Die Funktionen IRF4s sind an seine verschiedenen Proteindomänen gebunden (Biswas et al., 2010b; Negishi et al., 2005). Durch Mutation dieser Domänen ließen sich *gain*- und *loss of function* Varianten von IRF4 herstellen. Der Effekt solcher Varianten auf den SLE bleibt ein wichtiges, offenes Thema. Im Rahmen weiterer Untersuchungen müsste auch geklärt werden, welchen Effekt die IRF4-Defizienz auf pDCs hat, da diese Zellen in der Pathogenese des SLE eine entscheidende Rolle spielen. So wären hier eine Messung von Typ1-Interferonen im Plasma als auch eine Phänotypisierung der pDCs in B6^{Ipr/Irf4+/+} und B6^{Ipr/Irf4-/-} Mäusen notwendig. Ebenfalls weiter abklärungsbedürftig sind die verschiedenen Chemokin- und Zytokinantworten nach TLR-

Stimulation. Hier könnten mit intrazellulären, phosphorylierungssensitiven Antikörpern durchflusszytometrische Analysen erstellt werden, um den jeweiligen intrazellulären Signalweg nach TLR4, TLR7 und TLR9 Stimulation in IRF4-defizienten und IRF4-kompetenten Zellen zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Interferon-regulatorischen Faktor 4 in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses zu klären. Diese Fragestellung wurde aufgrund offensichtlicher Probleme bei Untersuchung im humanen SLE im Mausmodell bearbeitet. Dabei ist es wichtig, immer in Erinnerung zu behalten, dass auch bei Verwendung eines Säugetier-Modells große biologische Unterschiede zwischen Maus und Mensch bestehen. Dies macht es anspruchsvoll, Erkenntnisse aus einem Organismus auf den anderen zu übertragen. Nur exemplarisch sei hier eine in den *Proceedings of the National Academy of Sciences* veröffentlichte Arbeit zitiert (Seok et al., 2013), die gezeigt hat, dass die differentielle Genexpression in Leukozyten von Schwerbrandverletzten, Polytrauma- und Sepsispatienten jeweils Korrelationskoeffizienten $R^2=0,91$ (Verbrennung/Polytrauma) und $R^2=0,47$ (sowohl Verbrennung/Sepsis als auch Polytrauma/Sepsis) aufweist, das humane Setting mit dem jeweiligen murinen Modell allerdings Koeffizienten von $R^2<0,1$ i.e. keinerlei Korrelation aufweist. Trotz dieser wichtigen Einschränkung der Forschung am Mausmodell darf nicht vergessen werden, dass gerade in der SLE-Forschung mit Benlysta® (Belimumab) die erste Neuzulassung seit über 50 Jahren in der Mausforschung entdeckt wurde (Hahn, 2013). Für die weitere Erforschung der Fragestellung, ob sich der im Rahmen der IRF4-Defizienz gefundene Schutz vor SLE-Organschäden therapeutisch nutzen lässt, muss die biologische Funktion von IRF4, insbesondere seine differentielle Funktion in innater und adaptiver Immunität deutlich besser verstanden werden.

5 Zusammenfassung

Trotz einer deutlichen Verbesserung der Prognose bleibt der systemische Lupus erythematoses (SLE) eine unheilbare Autoimmunkrankheit mit hoher Mortalität und insbesondere Morbidität. Da bei unvollständig verstandener Pathogenese weiterhin nur symptomatische Behandlungen verfügbar sind, steigt die Prävalenz des systemischen Lupus kontinuierlich, wobei die verursachten Kosten durch Behandlung und Arbeitsausfall aktuell in den USA jährlich bei umgerechnet über 10 Mrd. Euro liegen. Bisher ist bekannt, dass der Endorganschaden durch das Auftreten von autoreaktiven T-Zellen und insb. B-Zellen sowie von diesen produzierten Autoantikörpern vermittelt wird, sodass die Behandlung in vielen Fällen der Chemotherapie niedrig-maligner B-Zell-Lymphome ähnelt und daher viele unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringt. Die genaue Art und Herkunft der nukleären Autoantigene ist bislang ebenso unbekannt wie die beteiligten molekularen Signalwege, wobei hier unter anderem Toll-like-Rezeptoren sowie deren intrazelluläre Signalkaskaden, inklusive der Interferon-regulatorischen Faktoren (IRFs) diskutiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Interferon-regulatorischen Faktor 4 (IRF4) in der Entstehung des systemischen Lupus erythematoses zu untersuchen. IRF4 wird fast ausschließlich in Zellen des Immunsystems exprimiert und reguliert als Transkriptionsfaktor die Entwicklung und Polarisierung von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen. Zusätzlich wirkt IRF4 aber insbesondere in dendritischen Zellen auch als negativer Regulator des pro-entzündlichen Toll-like-Rezeptor-Signalweges. Diese duale Rolle von IRF4 spiegelt sich auch in den Auswirkungen auf die Krankheitsentwicklung im untersuchten murinen SLE-Modell wieder: Während im Vergleich zu IRF4-kompetenten (wt) Mäusen IRF4-defiziente (KO) Tiere deutlich früher und stärker ausgeprägt Zeichen der systemischen Entzündung zeigen, sind sie vor der Entwicklung der SLE-typischen Endorganschäden vollständig geschützt. So weisen IRF4-KO-Mäuse stark erhöhte Plasmaspiegel von IL-12 und TNF- α sowie eine ausgeprägte Splenomegalie auf, zeigen aber weder detektierbare Autoantikörper im Plasma noch die typische Lupusnephritis. Neben der Wichtigkeit von autoreaktiven Lymphozyten in der Pathogenese des SLE zeigt die vorliegende Arbeit damit, dass trotz hyperaktiver innater Immunität der autoimmune Endorganschaden vermieden werden kann, was perspektivisch die Möglichkeiten einer eher immunmodulatorischen als rein immunsuppressiven Therapie mit ihren zahlreichen Nebenwirkungen aufzeigt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AICE	<i>AP-1/IRF-composite element</i>
AIM-2	<i>absent in melanoma-2</i>
Ak	Antikörper
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Arg1	Arginase1
BC	B-Zelle
BCL	<i>B cell lymphoma protein</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
BLyS	B-Lymphozyten-Stimulator = BAFF
BM-DC	<i>bone marrow-derived DC</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CCL	Chemokin vom C-C Typ
CCR	CCL-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	klassische DC
Cdkn	<i>cyclin-dependent kinase Inhibitor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> = mRNA-Transkript
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CpG	Cytosinphosphatidylguanin
CR	Komplementrezeptor
Ct	<i>cycle threshold</i>
CXCL	Chemokin vom C-X-C Typ
CXCR	CXCL-Rezeptor
DAMP	Gefahr-assoziiertes molekulares Muster
DC	Dendritische Zelle
DN	CD4/CD8 doppelt negative T-Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EICE	<i>Ets/IRF- composite element und das</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Ets	E26 transformation-specific
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FasL	Fas-Ligand
Fc	Fragment (<i>constant</i>)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIZZ1	<i>found in inflammatory zone 1</i>
Flt-3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FoBC	Follikel-assozierte B-Zelle
FSC	<i>forward scatter</i>
GM-CSF	PMC/Mφ-Kolonie stimulierender Faktor
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
GZBZ	Keimzentrums-B-Zelle
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HMGB1	<i>high mobility group box-1 protein</i>
IFN	Interferon
IFIT	<i>IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILL	<i>innate-like lymphocyte</i>
Imi	Imiquimod
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPS-1	<i>IFN-β-promoter stimulator 1</i>
IRAK	IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase
IRF	IFN-regulatorischer Faktor
ISGF	<i>Interferon-stimulated gene factor</i>
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>

ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
KIR	<i>NK-cell Ig-like receptor</i>
LT	Lymphotoxin
lpr	<i>lymphoproliferation/ lupus prone</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mφ	Makrophage
MACS	Magnet-aktivierte Zellsortierung
MAPK	mitogen-assoziierte Proteinkinase
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MRC1	Mannoserezeptor C-Typ Lektin 1
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
MZ	Marginalzone
MZBC	Marginazonen-B-Zelle
NCR	Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFkB	<i>nuclear factor κ B</i>
NK –Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NKG2D	NK-Zell Gruppe 2, Protein D
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
NS-IK	Nukleinsäure-haltiger Immunkomplex
OD	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide DC
PMC	polymorphonukleäre Zellen = Granulozyten
PRR	Mustererkennungsrezeptor

PRDM1	<i>PR domain zinc finger protein 1 = Blimp-1</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAG	<i>recombination activating gene</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen 1
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	freie Sauerstoffradikale
RSV	respiratorisches Synzytialvirus
RT	reverse Transkriptase
SIGIRR	<i>single Ig IL-1-related receptor</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SLPI	Sekretorischer Leukoprotease-Inhibitor
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAK	TGF-β-aktivierte Kinase
TANK	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator</i>
TBK	TANK bindende Kinase
TC	T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
Th	T-Helferzelle
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrose-Faktor α
TRAM	<i>TRIF related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIRAP-inducing IFN-β</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
Ym1	<i>Chitinase 3-like-3 protein</i>

7 Literaturverzeichnis

- Akahoshi, M., H. Nakashima, A. Sadanaga, K. Miyake, K. Obara, M. Tamari, T. Hirota, A. Matsuda, and T. Shirakawa. 2008. Promoter polymorphisms in the IRF3 gene confer protection against systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:568-574.
- Akdis, M., O. Palomares, W. van de Veen, M. van Splunter, and C.A. Akdis. 2012. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 129:1438-1449; quiz1450-1431.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Anders, H.J. 2009. Pseudoviral immunity - a novel concept for lupus. *Trends Mol Med* 15:553-561.
- Anders, H.J., and D. Schlondorff. 2007. Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16:177-183.
- Andrews, B.S., R.A. Eisenberg, A.N. Theofilopoulos, S. Izui, C.B. Wilson, P.J. McConahey, E.D. Murphy, J.B. Roths, and F.J. Dixon. 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 148:1198-1215.
- Austin, H.A., 3rd, L.R. Muenz, K.M. Joyce, T.T. Antonovych, and J.E. Balow. 1984. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 25:689-695.
- Baccala, R., R. Gonzalez-Quintial, A.L. Blasius, I. Rimann, K. Ozato, D.H. Kono, B. Beutler, and A.N. Theofilopoulos. 2013. Essential requirement for IRF8 and SLC15A4 implicates plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:2940-2945.
- Bagavant, H., and S.M. Fu. 2009. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 21:489-494.
- Banchereau, J., V. Pascual, and A. O'Garra. 2012. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol* 13:925-931.
- Barnes, B.J., M.J. Kellum, A.E. Field, and P.M. Pitha. 2002. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 22:5721-5740.
- Bauer, M., A.T. Press, and M. Trauner. 2013. The liver in sepsis: patterns of response and injury. *Curr Opin Crit Care* 19:123-127.
- Baumjohann, D., and K.M. Ansel. 2013. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol* 13:666-678.
- Belot, A., and R. Cimaz. 2012. Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis. *Pediatr Rheumatol Online J* 10:21.
- Bennett, L., A.K. Palucka, E. Arce, V. Cantrell, J. Borvak, J. Banchereau, and V. Pascual. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197:711-723.
- Bernatsky, S., D. Levy, R. Ramsey-Goldman, C. Gordon, A. Rahman, and A.E. Clarke. 2012. Mortality in SLE. In Dubois' lupus erythematosus and related syndromes. B. Hahn, and D.J. Wallace, editors. Elsevier/Saunders, Philadelphia. 484-494.
- Biswas, P.S., G. Bhagat, and A.B. Pernis. 2010a. IRF4 and its regulators: evolving insights into the pathogenesis of inflammatory arthritis? *Immunol Rev* 233:79-96.
- Biswas, P.S., S. Gupta, E. Chang, L. Song, R.A. Stirzaker, J.K. Liao, G. Bhagat, and A.B. Pernis. 2010b. Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21

- production and the development of autoimmunity in mice. *J Clin Invest* 120:3280-3295.
- Blum, J.S., P.A. Wearsch, and P. Cresswell. 2013. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:443-473.
- Boguniewicz, M., and D.Y. Leung. 2011. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 242:233-246.
- Bollig, N., A. Brustle, K. Kellner, W. Ackermann, E. Abass, H. Raifer, B. Camara, C. Brendel, G. Giel, E. Bothur, M. Huber, C. Paul, A. Elli, R.A. Kroczek, R. Nurieva, C. Dong, R. Jacob, T.W. Mak, and M. Lohoff. 2012. Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8664-8669.
- Bosch, X. 2011. Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. *N Engl J Med* 365:758-760.
- Boyum, A. 1964. Separation of White Blood Cells. *Nature* 204:793-794.
- Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T.W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8:958-966.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, and C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611-622.
- Buyon, J.P., and R.M. Clancy. 2003. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Semin Arthritis Rheum* 33:140-154.
- Buyon, J.P., M.A. Petri, M.Y. Kim, K.C. Kalunian, J. Grossman, B.H. Hahn, J.T. Merrill, L. Sammaritano, M. Lockshin, G.S. Alarcon, S. Manzi, H.M. Belmont, A.D. Askanase, L. Sigler, M.A. Dooley, J. Von Feldt, W.J. McCune, A. Friedman, J. Wachs, M. Cronin, M. Hearth-Holmes, M. Tan, and F. Licciardi. 2005. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med* 142:953-962.
- Carroll, M.C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 16:545-568.
- Chang, A.Y., and V.P. Werth. 2011. Treatment of cutaneous lupus. *Curr Rheumatol Rep* 13:300-307.
- Clark, D.N., J.L. Markham, C.S. Sloan, and B.D. Poole. 2013. Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 148:335-343.
- Clarke, S.H., and L.W. Arnold. 1998. B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig)M⁺ B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J Exp Med* 187:1325-1334.
- Collins, E., and G. Gilkeson. 2013. Hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of refractory systemic lupus erythematosus--where are we now? *Clin Immunol* 148:328-334.
- Conroy, H., N.A. Marshall, and K.H. Mills. 2008. TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells? A double-edged sword in immunity to tumours. *Oncogene* 27:168-180.
- Consortium, H.M.P. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-214.
- Cretney, E., A. Xin, W. Shi, M. Minnich, F. Masson, M. Miasari, G.T. Belz, G.K. Smyth, M. Busslinger, S.L. Nutt, and A. Kallies. 2011. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* 12:304-311.

- Danchenko, N., J.A. Satia, and M.S. Anthony. 2006. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 15:308-318.
- Davidson, A., and C. Aranow. 2010. Lupus nephritis: lessons from murine models. *Nat Rev Rheumatol* 6:13-20.
- Deng, Y., and B.P. Tsao. 2013. Genetics of Human SLE. In Dubois' lupus erythematosus and related syndromes. D.J. Wallace, B. Hahn, and E.L. Dubois, editors. Elsevier/Saunders, Philadelphia, PA. 35-45.
- Di Bernardo, M.C., D. Crowther-Swanepoel, P. Broderick, E. Webb, G. Sellick, R. Wild, K. Sullivan, J. Vijayakrishnan, Y. Wang, A.M. Pittman, N.J. Sunter, A.G. Hall, M.J. Dyer, E. Matutes, C. Dearden, T. Mainou-Fowler, G.H. Jackson, G. Summerfield, R.J. Harris, A.R. Pettitt, P. Hillmen, D.J. Allsup, J.R. Bailey, G. Pratt, C. Pepper, C. Fegan, J.M. Allan, D. Catovsky, and R.S. Houlston. 2008. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 40:1204-1210.
- Dinarello, C.A. 1984. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* 311:1413-1418.
- Dubois, E.L., R.E. Horowitz, H.B. Demopoulos, and R. Teplitz. 1966. NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus. *JAMA* 195:285-289.
- Eckburg, P.B., E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, and D.A. Relman. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
- Ekblom-Kullberg, S., H. Kautiainen, P. Alha, M. Leirisalo-Repo, and H. Julkunen. 2013. Smoking and the risk of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*
- Engel, I., and C. Murre. 2001. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol* 1:193-199.
- Fanzo, J.C., W. Yang, S.Y. Jang, S. Gupta, Q. Chen, A. Siddiq, S. Greenberg, and A.B. Pernis. 2006. Loss of IRF-4-binding protein leads to the spontaneous development of systemic autoimmunity. *J Clin Invest* 116:703-714.
- Fauci, A.S. 2008. Harrison's principles of internal medicine / editors, Anthony S. Fauci ... [et al.]. McGraw-Hill Medical, New York. v. <1-2> pp.
- Fournel, C., L. Chabanne, C. Caux, J.R. Faure, D. Rigal, J.P. Magnol, and J.C. Monier. 1992. Canine systemic lupus erythematosus. I: A study of 75 cases. *Lupus* 1:133-139.
- Fu, Q., J. Zhao, X. Qian, J.L. Wong, K.M. Kaufman, C.Y. Yu, M.Y. Mok, J.B. Harley, J.M. Guthridge, Y.W. Song, S.K. Cho, S.C. Bae, J.M. Grossman, B.H. Hahn, F.C. Arnett, N. Shen, and B.P. Tsao. 2011. Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 63:749-754.
- Furtado, J., and D.A. Isenberg. 2013. B cell elimination in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 146:90-103.
- Gabay, C., and I. Kushner. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454.
- Gallo, R.L., and L.V. Hooper. 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12:503-516.
- Gao, Y., S.A. Nish, R. Jiang, L. Hou, P. Licona-Limon, J.S. Weinstein, H. Zhao, and R. Medzhitov. 2013. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* 39:722-732.
- Gareau, M.G., P.M. Sherman, and W.A. Walker. 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:503-514.
- Geissmann, F., M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.

- Geor, R.J., E.G. Clark, D.M. Haines, and P.G. Napier. 1990. Systemic lupus erythematosus in a filly. *J Am Vet Med Assoc* 197:1489-1492.
- Gill, S.R., M. Pop, R.T. Deboy, P.B. Eckburg, P.J. Turnbaugh, B.S. Samuel, J.I. Gordon, D.A. Relman, C.M. Fraser-Liggett, and K.E. Nelson. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312:1355-1359.
- Gilmore, T.D., and F.S. Wolenski. 2012. NF-kappaB: where did it come from and why? *Immunol Rev* 246:14-35.
- Graham, R.R., S.V. Kozyrev, E.C. Baechler, M.V. Reddy, R.M. Plenge, J.W. Bauer, W.A. Ortmann, T. Koeuth, M.F. Gonzalez Escribano, B. Pons-Estel, M. Petri, M. Daly, P.K. Gregersen, J. Martin, D. Altshuler, T.W. Behrens, and M.E. Alarcon-Riquelme. 2006. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 38:550-555.
- Graham, R.R., C. Kyogoku, S. Sigurdsson, I.A. Vlasova, L.R. Davies, E.C. Baechler, R.M. Plenge, T. Koeuth, W.A. Ortmann, G. Hom, J.W. Bauer, C. Gillett, N. Burtt, D.S. Cunningham Graham, R. Onofrio, M. Petri, I. Gunnarsson, E. Svenungsson, L. Ronnblom, G. Nordmark, P.K. Gregersen, K. Moser, P.M. Gaffney, L.A. Criswell, T.J. Vyse, A.C. Syvanen, P.R. Bohjanen, M.J. Daly, T.W. Behrens, and D. Altshuler. 2007. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6758-6763.
- Guinamard, R., M. Okigaki, J. Schlessinger, and J.V. Ravetch. 2000. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 1:31-36.
- Hahn, B.H. 2008. Systemic Lupus Erythematosus. In Harrison's principles of internal medicine / editors, Anthony S. Fauci ... [et al.]. A.S. Fauci, editor McGraw-Hill Medical, New York. v. <1-2>.
- Hahn, B.H. 2013. Belimumab for systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 368:1528-1535.
- Halliwell, R.E. 1982. Autoimmune diseases in domestic animals. *J Am Vet Med Assoc* 181:1088-1096.
- Heyman, B. 2000. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 18:709-737.
- Hikami, K., A. Kawasaki, I. Ito, M. Koga, S. Ito, T. Hayashi, I. Matsumoto, A. Tsutsumi, M. Kusaoi, Y. Takasaki, H. Hashimoto, T. Arinami, T. Sumida, and N. Tsuchiya. 2011. Association of a functional polymorphism in the 3'-untranslated region of SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 63:755-763.
- Hivroz, C., K. Chemin, M. Tourret, and A. Bohineust. 2012. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 32:139-155.
- Hochberg, M.C. 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725.
- Holodick, N.E., J.R. Tumang, and T.L. Rothstein. 2010. Immunoglobulin secretion by B1 cells: differential intensity and IRF4-dependence of spontaneous IgM secretion by peritoneal and splenic B1 cells. *Eur J Immunol* 40:3007-3016.
- Hom, G., R.R. Graham, B. Modrek, K.E. Taylor, W. Ortmann, S. Garnier, A.T. Lee, S.A. Chung, R.C. Ferreira, P.V. Pant, D.G. Ballinger, R. Kosoy, F.Y. Demirci, M.I. Kamboh, A.H. Kao, C. Tian, I. Gunnarsson, A.A. Bengtsson, S. Rantapaa-Dahlqvist, M. Petri, S. Manzi, M.F. Seldin, L. Ronnblom, A.C. Syvanen, L.A. Criswell, P.K. Gregersen, and T.W. Behrens. 2008. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* 358:900-909.

- Honma, K., H. Udon, T. Kohno, K. Yamamoto, A. Ogawa, T. Takemori, A. Kumatori, S. Suzuki, T. Matsuyama, and K. Yui. 2005. Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16001-16006.
- Houssiau, F.A. 2012. Therapy of lupus nephritis: lessons learned from clinical research and daily care of patients. *Arthritis Res Ther* 14:202.
- Huber, M., S. Heink, A. Pagenstecher, K. Reinhard, J. Ritter, A. Visekruna, A. Guralnik, N. Bollig, K. Jeltsch, C. Heinemann, E. Wittmann, T. Buch, O. Prazeres da Costa, A. Brustle, D. Brenner, T.W. Mak, H.W. Mittrucker, B. Tackenberg, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2013. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 123:247-260.
- Iaccarino, L., M. Gatto, S. Bettio, F. Caso, M. Rampudda, M. Zen, A. Ghirardello, L. Punzi, and A. Doria. 2013. Overlap connective tissue disease syndromes. *Autoimmun Rev* 12:363-373.
- Iida, S., P.H. Rao, M. Butler, P. Corradini, M. Boccadoro, B. Klein, R.S. Chaganti, and R. Dalla-Favera. 1997. Dereulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet* 17:226-230.
- Ito, M., S. Iida, H. Inagaki, K. Tsuboi, H. Komatsu, M. Yamaguchi, N. Nakamura, R. Suzuki, M. Seto, S. Nakamura, Y. Morishima, and R. Ueda. 2002. MUM1/IRF4 expression is an unfavorable prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL). *Jpn J Cancer Res* 93:685-694.
- James, J.A., J.B. Harley, and R.H. Scofield. 2006. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 18:462-467.
- Janeway, C., and e. al. 2008a. Chapter 2: Innate Immunity. In Janeway's immunobiology. K. Murphy, P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, editors. Garland Science, New York. xxi, 887 p.
- Janeway, C., and e. al. 2008b. Chapter 7: The development and survival of lymphocytes. In Janeway's immunobiology. K. Murphy, P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, editors. Garland Science, New York. xxi, 887 p.
- Janeway, C., and e. al. 2008c. Chapter 16: Evolution of the Immune System. In Janeway's immunobiology. K. Murphy, P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, editors. Garland Science, New York. xxi, 887 p.
- Kaplan, M.H. 2013. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* 252:104-115.
- Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
- Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474:307-317.
- Kiriakidou, M., D. Cotton, D. Taichman, and S. Williams. 2013. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 159:ITC4-1.
- Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9:833-844.
- Klein, U., S. Casola, G. Cattoretti, Q. Shen, M. Lia, T. Mo, T. Ludwig, K. Rajewsky, and R. Dalla-Favera. 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 7:773-782.
- La Cava, A. 2013. Targeting the BLyS-APRIL signaling pathway in SLE. *Clin Immunol* 148:322-327.
- Lartigue, A., N. Colliou, S. Calbo, A. Francois, S. Jacquot, C. Arnoult, F. Tron, D. Gilbert, and P. Musette. 2009. Critical role of TLR2 and TLR4 in autoantibody production and glomerulonephritis in lpr mutation-induced mouse lupus. *J Immunol* 183:6207-6216.

- Lassen, S., M. Lech, C. Rommele, H.W. Mittruecker, T.W. Mak, and H.J. Anders. 2010. Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure. *J Immunol* 185:1976-1983.
- Lazorchak, A.S., M.S. Schlissel, and Y. Zhuang. 2006. E2A and IRF-4/Pip promote chromatin modification and transcription of the immunoglobulin kappa locus in pre-B cells. *Mol Cell Biol* 26:810-821.
- Lech, M., and H.J. Anders. 2013. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 24:1357-1366.
- Lech, M., R. Grobmayr, M. Weidenbusch, and H.J. Anders. 2012. Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments. *Mediators Inflamm* 2012:951390.
- Lech, M., C. Kantner, O.P. Kulkarni, M. Ryu, E. Vlasova, J. Heesemann, D. Anz, S. Endres, K.S. Kobayashi, R.A. Flavell, J. Martin, and H.J. Anders. 2011a. Interleukin-1 receptor-associated kinase-M suppresses systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 70:2207-2217.
- Lech, M., O.P. Kulkarni, S. Pfeiffer, E. Savarese, A. Krug, C. Garlanda, A. Mantovani, and H.J. Anders. 2008. Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens. *J Exp Med* 205:1879-1888.
- Lech, M., C. Rommele, O.P. Kulkarni, H.E. Susanti, A. Migliorini, C. Garlanda, A. Mantovani, and H.J. Anders. 2011b. Lack of the long pentraxin PTX3 promotes autoimmune lung disease but not glomerulonephritis in murine systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 6:e20118.
- Lech, M., V. Skuginna, O.P. Kulkarni, J. Gong, T. Wei, R.W. Stark, C. Garlanda, A. Mantovani, and H.J. Anders. 2010. Lack of SIGIRR/TIR8 aggravates hydrocarbon oil-induced lupus nephritis. *J Pathol* 220:596-607.
- Levine, M., and R. Tjian. 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424:147-151.
- Lewis, R.M., R. Schwartz, and W.B. Henry, Jr. 1965. Canine Systemic Lupus Erythematosus. *Blood* 25:143-160.
- Liu, S.S., D. Ye, J. Lou, Z. Fan, and D.Q. Ye. 2013. No evidence for a genetic association of IRF4 with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Z Rheumatol*
- Liu, Z., and A. Davidson. 2012. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* 18:871-882.
- Lohoff, M., H.W. Mittrucker, A. Brustle, F. Sommer, B. Casper, M. Huber, D.A. Ferrick, G.S. Duncan, and T.W. Mak. 2004. Enhanced TCR-induced apoptosis in interferon regulatory factor 4-deficient CD4(+) Th cells. *J Exp Med* 200:247-253.
- Lohoff, M., H.W. Mittrucker, S. Prechtel, S. Bischof, F. Sommer, S. Kock, D.A. Ferrick, G.S. Duncan, A. Gessner, and T.W. Mak. 2002. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11808-11812.
- Lu, R. 2008. Interferon regulatory factor 4 and 8 in B-cell development. *Trends Immunol* 29:487-492.
- Malinow, M.R., E.J. Bardana, Jr., B. Pirofsky, S. Craig, and P. McLaughlin. 1982. Systemic lupus erythematosus-like syndrome in monkeys fed alfalfa sprouts: role of a nonprotein amino acid. *Science* 216:415-417.
- Man, K., M. Miasari, W. Shi, A. Xin, D.C. Henstridge, S. Preston, M. Pellegrini, G.T. Belz, G.K. Smyth, M.A. Febbraio, S.L. Nutt, and A. Kallies. 2013. The transcription factor

- IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol* 14:1155-1165.
- Marecki, S., and M.J. Fenton. 2002. The role of IRF-4 in transcriptional regulation. *J Interferon Cytokine Res* 22:121-133.
- Marshak-Rothstein, A., and I.R. Rifkin. 2007. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 25:419-441.
- Matsuyama, T., A. Grossman, H.W. Mittrucker, D.P. Siderovski, F. Kiefer, T. Kawakami, C.D. Richardson, T. Taniguchi, S.K. Yoshinaga, and T.W. Mak. 1995. Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). *Nucleic Acids Res* 23:2127-2136.
- Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell. 2013. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol*
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563-604.
- Merrill, J.T., R. Burgos-Vargas, R. Westhovens, A. Chalmers, D. D'Cruz, D.J. Wallace, S.C. Bae, L. Sigal, J.C. Becker, S. Kelly, K. Raghupathi, T. Li, Y. Peng, M. Kinaszczuk, and P. Nash. 2010a. The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life-threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: results of a twelve-month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 62:3077-3087.
- Merrill, J.T., C.M. Neuwelt, D.J. Wallace, J.C. Shanahan, K.M. Latinis, J.C. Oates, T.O. Utset, C. Gordon, D.A. Isenberg, H.J. Hsieh, D. Zhang, and P.G. Brunetta. 2010b. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum* 62:222-233.
- Metchnikoff, E., and F.G. Binnie. 1905. Immunity in infective diseases. University Press, Cambridge, xvi, 591 p. pp.
- Mittrucker, H.W., T. Matsuyama, A. Grossman, T.M. Kundig, J. Potter, A. Shahinian, A. Wakeham, B. Patterson, P.S. Ohashi, and T.W. Mak. 1997. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275:540-543.
- Mok, C.C., R.C. Kwok, and P.S. Yip. 2013. Effect of renal disease on the standardized mortality ratio and life expectancy of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 65:2154-2160.
- Mudter, J., L. Amoussina, M. Schenk, J. Yu, A. Brustle, B. Weigmann, R. Atreya, S. Wirtz, C. Becker, A. Hoffman, I. Atreya, S. Biesterfeld, P.R. Galle, H.A. Lehr, S. Rose-John, C. Mueller, M. Lohhoff, and M.F. Neurath. 2008. The transcription factor IFN regulatory factor-4 controls experimental colitis in mice via T cell-derived IL-6. *J Clin Invest* 118:2415-2426.
- Mullis, K., F. Falloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.
- Murphy, K., P. Travers, M. Walport, and C. Janeway. 2008. Janeway's immunobiology. Garland Science, New York. xxi, 887 p. pp.
- Murphy, T.L., R. Tussiwand, and K.M. Murphy. 2013. Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat Rev Immunol* 13:499-509.

- Narshi, C.B., I.P. Giles, and A. Rahman. 2011. The endothelium: an interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus* 20:5-13.
- Neefjes, J., M.L. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823-836.
- Negishi, H., Y. Ohba, H. Yanai, A. Takaoka, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Taniguchi, and K. Honda. 2005. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15989-15994.
- Nemazee, D. 2000. Receptor editing in B cells. *Adv Immunol* 74:89-126.
- Nickerson, K.M., S.R. Christensen, J. Shupe, M. Kashgarian, D. Kim, K. Elkon, and M.J. Shlomchik. 2010. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J Immunol* 184:1840-1848.
- Ochsenbein, A.F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156-2159.
- Patel, D., and B. Richardson. 2012. Drug-Induced Lupus: Etiology, Pathogenesis, and Clinical Aspects. In Dubois' lupus erythematosus and related syndromes. B. Hahn, and D.J. Wallace, editors. Elsevier/Saunders, Philadelphia. 484-494.
- Pathak, S., S. Ma, L. Trinh, and R. Lu. 2008. A role for interferon regulatory factor 4 in receptor editing. *Mol Cell Biol* 28:2815-2824.
- Peponis, V., V.C. Kyttaris, C. Tyradellis, I. Vergados, and N.M. Sitaras. 2006. Ocular manifestations of systemic lupus erythematosus: a clinical review. *Lupus* 15:3-12.
- Perry, D., A. Sang, Y. Yin, Y.Y. Zheng, and L. Morel. 2011. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011:271694.
- Pillai, S., and A. Cariappa. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 9:767-777.
- Pluddemann, A., C. Neyen, and S. Gordon. 2007. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43:207-217.
- Pons-Estel, B.A., L.J. Catoggio, M.H. Cardiel, E.R. Soriano, S. Gentiletti, A.R. Villa, I. Abadi, F. Caeiro, A. Alvarellos, and D. Alarcon-Segovia. 2004. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine (Baltimore)* 83:1-17.
- Pons-Estel, G.J., G.S. Alarcon, L. Scofield, L. Reinlib, and G.S. Cooper. 2010. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 39:257-268.
- Pontoglio, M., M. Pausa, A. Doyen, B. Viollet, M. Yaniv, and F. Tedesco. 2001. Hepatocyte nuclear factor 1alpha controls the expression of terminal complement genes. *J Exp Med* 194:1683-1689.
- Praetorius, C., C. Grill, S.N. Stacey, A.M. Metcalf, D.U. Gorkin, K.C. Robinson, E. Van Otterloo, R.S. Kim, K. Bergsteinsdottir, M.H. Ogmundsdottir, E. Magnusdottir, P.J. Mishra, S.R. Davis, T. Guo, M.R. Zaidi, A.S. Helgason, M.I. Sigurdsson, P.S. Meltzer, G. Merlino, V. Petit, L. Larue, S.K. Loftus, D.R. Adams, U. Sobhiafshar, N.C. Emre, W.J. Pavan, R. Cornell, A.G. Smith, A.S. McCallion, D.E. Fisher, K. Stefansson, R.A. Sturm, and E. Steingrimsson. 2013. A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. *Cell* 155:1022-1033.
- Qian, C., L. Qian, Y. Yu, H. An, Z. Guo, Y. Han, Y. Chen, Y. Bai, Q. Wang, and X. Cao. 2013. Fas signal promotes the immunosuppressive function of regulatory dendritic cells via the ERK/beta-catenin pathway. *J Biol Chem* 288:27825-27835.

- Raczkowski, F., J. Ritter, K. Heesch, V. Schumacher, A. Guralnik, L. Hocker, H. Raifer, M. Klein, T. Bopp, H. Harb, D.A. Kesper, P.I. Pfefferle, M. Grusdat, P.A. Lang, H.W. Mittrucker, and M. Huber. 2013. The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:15019-15024.
- Rahman, A., and D.A. Isenberg. 2008. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 358:929-939.
- Ravichandran, K.S., and U. Lorenz. 2007. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 7:964-974.
- Reap, E.A., D. Leslie, M. Abrahams, R.A. Eisenberg, and P.L. Cohen. 1995. Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune lpr and gld mice. *J Immunol* 154:936-943.
- Reilly, C.M., S. Olgun, D. Goodwin, R.M. Gogal, Jr., A. Santo, J.W. Romesburg, S.A. Ahmed, and G.S. Gilkeson. 2006. Interferon regulatory factor-1 gene deletion decreases glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 36:1296-1308.
- Reizis, B., A. Bunin, H.S. Ghosh, K.L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 29:163-183.
- Richez, C., K. Yasuda, R.G. Bonegio, A.A. Watkins, T. Aprahamian, P. Bustos, R.J. Richards, C.L. Liu, R. Cheung, P.J. Utz, A. Marshak-Rothstein, and I.R. Rifkin. 2010. IFN regulatory factor 5 is required for disease development in the FcgammaRIIB-/-Yaa and FcgammaRIIB-/- mouse models of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 184:796-806.
- Robertson, E., A. Bradley, M. Kuehn, and M. Evans. 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323:445-448.
- Rovin, B.H., R. Furie, K. Latinis, R.J. Looney, F.C. Fervenza, J. Sanchez-Guerrero, R. Maciuca, D. Zhang, J.P. Garg, P. Brunetta, and G. Appel. 2012. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum* 64:1215-1226.
- Ruiz-Irastorza, G., F. Lima, J. Alves, M.A. Khamashta, J. Simpson, G.R. Hughes, and N.M. Buchanan. 1996. Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium: a prospective study of 78 pregnancies. *Br J Rheumatol* 35:133-138.
- Satoh, M., A. Kumar, Y.S. Kanwar, and W.H. Reeves. 1995. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10934-10938.
- Satoh, T., O. Takeuchi, A. Vandenbon, K. Yasuda, Y. Tanaka, Y. Kumagai, T. Miyake, K. Matsushita, T. Okazaki, T. Saitoh, K. Honma, T. Matsuyama, K. Yui, T. Tsujimura, D.M. Standley, K. Nakanishi, K. Nakai, and S. Akira. 2010. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 11:936-944.
- Sauer, B. 2002. Cre/lox: one more step in the taming of the genome. *Endocrine* 19:221-228.
- Savage, D.C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31:107-133.
- Savitsky, D., T. Tamura, H. Yanai, and T. Taniguchi. 2010. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother* 59:489-510.
- Sciammas, R., A.L. Shaffer, J.H. Schatz, H. Zhao, L.M. Staudt, and H. Singh. 2006. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25:225-236.
- Seok, J., H.S. Warren, A.G. Cuenca, M.N. Mindrinos, H.V. Baker, W. Xu, D.R. Richards, G.P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C.C. Finnerty, C.M. Lopez, S. Honari,

- E.E. Moore, J.P. Minei, J. Cuschieri, P.E. Bankey, J.L. Johnson, J. Sperry, A.B. Nathens, T.R. Billiar, M.A. West, M.G. Jeschke, M.B. Klein, R.L. Gamelli, N.S. Gibran, B.H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S.E. Calvano, P.H. Mason, J.P. Cobb, L.G. Rahme, S.F. Lowry, R.V. Maier, L.L. Moldawer, D.N. Herndon, R.W. Davis, W. Xiao, and R.G. Tompkins. 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:3507-3512.
- Shin, M.S., N. Lee, and I. Kang. 2011. Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol* 23:444-448.
- Shukla, V., S. Ma, R.R. Hardy, S.S. Joshi, and R. Lu. 2013. A role for IRF4 in the development of CLL. *Blood* 122:2848-2855.
- Smith-Bouvier, D.L., A.A. Divekar, M. Sasidhar, S. Du, S.K. Tiwari-Woodruff, J.K. King, A.P. Arnold, R.R. Singh, and R.R. Voskuhl. 2008. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J Exp Med* 205:1099-1108.
- Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
- Stranges, P.B., J. Watson, C.J. Cooper, C.M. Choisy-Rossi, A.C. Stonebraker, R.A. Beighton, H. Hartig, J.P. Sundberg, S. Servick, G. Kaufmann, P.J. Fink, and A.V. Chervonsky. 2007. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* 26:629-641.
- Sunderrajan, E.V., W.N. McKenzie, T.R. Lieske, J.L. Kavanaugh, S.R. Braun, and S.E. Walker. 1986. Pulmonary inflammation in autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mice. Histopathology and bronchoalveolar lavage evaluation. *Am J Pathol* 124:353-362.
- Suzuki, S., K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, I. Akitoyo, K. Yamamoto, T. Suematsu, M. Nakamura, K. Yui, and A. Kumatori. 2004. Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8981-8986.
- Tacke, F., and H.W. Zimmermann. 2014. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol*
- Tada, Y., S. Kondo, S. Aoki, S. Koarada, H. Inoue, R. Suematsu, A. Ohta, T.W. Mak, and K. Nagasawa. 2011. Interferon regulatory factor 5 is critical for the development of lupus in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 63:738-748.
- Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T.W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
- Teichmann, L.L., D. Schenten, R. Medzhitov, M. Kashgarian, and M.J. Shlomchik. 2013. Signals via the adaptor MyD88 in B cells and DCs make distinct and synergistic contributions to immune activation and tissue damage in lupus. *Immunity* 38:528-540.
- Tominaga, N., K. Ohkusu-Tsukada, H. Udon, R. Abe, T. Matsuyama, and K. Yui. 2003. Development of Th1 and not Th2 immune responses in mice lacking IFN-regulatory factor-4. *Int Immunol* 15:1-10.
- Trinchieri, G., and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
- Tsokos, G.C. 2011. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 365:2110-2121.
- Tsuboi, K., S. Iida, H. Inagaki, M. Kato, Y. Hayami, I. Hanamura, K. Miura, S. Harada, M. Kikuchi, H. Komatsu, S. Banno, A. Wakita, S. Nakamura, T. Eimoto, and R. Ueda. 2000. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 14:449-456.
- Turchetti, G., J. Yazdany, I. Palla, E. Yelin, and M. Mosca. 2012. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review and points to consider. *Clin Exp Rheumatol* 30:S116-122.

- Underhill, D.M., and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20:825-852.
- Vas, J., C. Gronwall, and G.J. Silverman. 2013. Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Front Immunol* 4:4.
- Walker, J.A., J.L. Barlow, and A.N. McKenzie. 2013. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 13:75-87.
- Wallach, D., T.B. Kang, and A. Kovalenko. 2014. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 14:51-59.
- Weidenbusch, M., and H.J. Anders. 2012. Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. *J Innate Immun* 4:463-477.
- Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud. 2009. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27:267-285.
- Xu, Y., Y. Zhan, A.M. Lew, S.H. Naik, and M.H. Kershaw. 2007. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 179:7577-7584.

8 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders, der in einzigartiger Weise meinen Weg von den vorklinischen Semestern des Studiums bis zum Abschluss dieser Dissertation begleitet hat und hoffentlich auch in Zukunft begleiten wird, als ein Mentor, ein Motivator, als ein großes Vorbild.

Ein sehr großer Dank geht an meinen Betreuer, Herrn Privatdozent Dr. rer. human. biol. Maciej Lech, für die Einarbeitung in alle Methoden, zahlreiche Hilfestellungen bei der Anfertigung meiner Dissertation und die immer freundliche Zusammenarbeit. Ein ebenso großer Dank geht an Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Bruno Luckow, für zahlreiche Diskussionen, wertvolle Hinweise und kritische Fragen.

Ein großer Dank geht an das DFG-Graduiertenkolleg 1202 und all seine Mitglieder, insbesondere natürlich an seinen Sprecher, Herrn Professor Dr. med. Stefan Endres, sowie meinen Comentor, Herrn Professor Dr. med. Max Schnurr, für die finanzielle und ideelle Förderung. Ebenso danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes für das großzügige Stipendium.

Ein besonderer Dank geht an all meine Laborkollegen für die freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie die Erklärungen und Hilfe bei vielen Methoden, insbesondere Onkar Kulkarni, Mi Ryu, Murthy Darisipudi, Veronika Skuginna, Allam Ramanjaneyulu, Khader Rupanagudi, Christoph Römmele, Christina Scherbaum, Shrikant Mulay, Jan Hagemann und Holger Hägele. Ein besonderer Dank geht auch an Janina Mandelbaum, Dan Draganovici, Nuru Eltrich, Ewa Radomska und Heni Susanti für die exzellente technische Unterstützung.

Ich danke meinen Freunden für die Unterstützung auch in schwierigen Phasen und das gemeinsame Feiern von Erfolgen, ganz besonders Joanna, Max, Konstantin und Jonas sowie Julius für viele gute Diskussionen.

Ein sehr besonderes Dankeschön geht an Natalie Garzorz, für alles, und an Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher, für sein unglaubliches Vertrauen.

In tiefster Verbundenheit danke ich meiner Familie, meinen lieben Eltern und meinen Brüdern Hans und Ernst, die immer für mich da waren und sind, und insbesondere meiner geliebten Frau Ghena, die mich liebevoll so sein lässt, wie ich bin.

9 Lebenslauf

Name: *Marc Johannes Weidenbusch*

Geburtsdatum: *13.05.1987*

Geburtsort: *München*

Eltern: *Joseph Weidenbusch*
Elisabeth Weidenbusch, geb. Winter

Schulausbildung: *Jagdfeldschule, Ernst-Mach-Gymnasium Haar*
2006 Allgemeine Hochschulreife (Abiturnote 1,2)

Studium: *2007 Präklinischer Studienabschnitt in München*
2009 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)
2009 Klinischer Studienabschnitt in München, Bern, New York
2013 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)

Stipendien: *2007 Aufnahme Studienstiftung des deutschen Volkes*
2010 Förderung DFG-Graduiertenkolleg 1202

Veröffentlichungen:

Lech M*, Weidenbusch M*, Kulkarni OP, Ryu M, Darisipudi MN, Susanti HE, Mittruecker HW, Mak TW, Anders HJ. IRF4 deficiency abrogates lupus nephritis despite enhancing systemic cytokine production. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Aug;22(8):1443-52.

*geteilte Erstautorenschaft

Weidenbusch M, Anders HJ. Tissue microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of inflammation and fibrosis. *Journal of Innate Immunity.* 2012;4(5-6):463-77.

Lech M, Gröbmayr R, Weidenbusch M, Anders HJ. Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:951390.

Weidenbusch M*, Römmele C*, Schrötle A, Anders HJ. Beyond the LUNAR trial. Efficacy of rituximab in refractory lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Jan;28(1):106-11.

*geteilte Erstautorenschaft

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand